

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



## **Estudo do mecanismo de ação de novos compostos de ruténio com atividade antitumoral**

Andreia Catarina Guerreiro Morais de Carvalho

**Mestrado em Bioquímica**  
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:

Doutora Ana Isabel Tomaz, Centro de Química Estrutural – Faculdade de Ciências,  
ULisboa

Professora Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos Fernandes, UCIBIO,  
Departamento de Ciências da Vida – Faculdade de Ciências e Tecnologia,  
Universidade Nova de Lisboa



## Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Doutora Ana Isabel Tomaz, pela oportunidade dada e pelo o apoio fornecido ao longo do ano. À Professora Doutora Alexandra Fernandes não só por me ter aceiteado no grupo *Human Genetics and Cancer Therapeutics* onde realizei todo o meu trabalho, mas também pela disponibilidade, pela confiança e por todas as oportunidades dadas ao longo deste ano.

A todos os membros do laboratório 319 e 315, onde estiveram sempre presentes quando mais precisava, um obrigado por todo o apoio, conselhos e brincadeiras! À Catarina Rodrigues pelo tempo despendido a ensinar as novas técnicas bem como a esclarecer as duvidas que apareceram ao longo do ano. À Rita Mendes e à Ana Sofia, por todo o apoio e ajuda que me deram ao longo do ano, obrigada por todas as gargalhadas fornecidas e por todos os desabafos! À Vanessa Silva, por toda a energia que compartilhava todos os dias, o teu apoio foi essencial durante este ano. À Ana Silva, a minha companheira durante este ano, um obrigado por todo o apoio e ajuda que me proporcionaste ao longo deste ano.

Aos meus amigos, Sofia, Leonor, Lota, Mendonça, Daniel, Miguel e Ricardo um GRANDE obrigado por estarem sempre presentes. O ano de tese nunca é fácil e a vocês ajudaram me sempre quando mais precisei. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos risos, pelas palhaçadas e por todos os momentos que estivemos juntos! À bestie Patrícia, que sempre estiveste presente quando eu mais precisava, após todos estes anos a nossa amizade vai prevalecer sempre, sei que contigo posso sempre contar! Depois de tudo o que se passou e ver que cheguei ao fim deste ano, só mostra que ainda vou passar grandes momentos com vocês!

Aos meus pais que foram os meus pilares durante este ano, as pessoas que sempre me deram todas as oportunidades que podiam. OBRIGADA por todo o amor, carinho, e apoio que me deram. Aqueles que ouviram os meus desabafos e me consolavam quando eu mais precisava. Sei que às vezes sou difícil de aturar, mas uma coisa que apreendi com vocês foi o facto de nunca desistir daquilo que eu mais gosto. Obrigada por tudo.

Por fim, muito obrigado a ti Filipe, pelos os desabafos que foste obrigado a ouvir, por toda a motivação e força que me deste ao longo deste ano. E acima de tudo por todo o teu amor e o apoio que me deste, este ano sem ti não teria sido o mesmo!

A pessoa que sou hoje é graças a todos vocês, por isso um muito obrigado!

## Resumo

A quimioterapia é um tratamento tradicional do cancro. Sua alta toxicidade, afetando tecidos saudáveis, e a resistência intrínseca a fármacos são obstáculos que precisam de ser superados. Desta forma, a identificação de novos agentes quimioterapêuticos é fundamental para novos progressos no tratamento do cancro. Uma abordagem inclui complexos de ruténio, que foram reconhecidos como uma alternativa promissora e efetiva aos agentes de platina actualmente em uso clínico.

O objetivo principal do presente trabalho consiste na avaliação do potencial antiproliferativo, bem como a identificação dos mecanismos de ação de complexos de ruténio(II) com co-ligandos da família das tiosemicarbazonas de formulação  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ , em que bpy corresponde a 2,2-bipiridina e HL o co-ligando tiosemicarbazona. Em concreto, estudaram-se os complexos  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL1})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (ACP19),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL2})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (SA25),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (SA22),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL4})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (SA23), e os respetivos ligandos, HL1 (TSC-IndNCH<sub>3</sub>), HL2 (TSC-Bztio), HL3 (TSC-OCH<sub>2</sub>) e HL4 (TSC-CH<sub>2</sub>OH). Os ensaios de viabilidade celular *in vitro* foram realizados nas linhas celulares tumorais, A2780 (linha celular do carcinoma do ovário), HCT116 (linha celular do carcinoma colorectal), A549 (linha celular do carcinoma do pulmão) e MCF-7 (linha celular do carcinoma da mama hormonodependente). Através destes resultados conclui-se que os ligandos não apresentavam citotoxicidade com a excepção do HL1. De entre os complexos avaliados, os complexos ACP19, SA25 e SA23 demonstraram ter a maior selectividade na linha tumoral A2780. Conclui-se que o complexo ACP19 e SA25 têm um maior efeito antiproliferativo e uma maior seletividade para a linha celular A2780 com valores IC<sub>50</sub> de 0,5 e 0,6 µM, respetivamente. Por este motivo, estes complexos foram escolhidos para a caracterização do seu mecanismos de ação na linha celular A2780.

Na presença dos complexos a linha celular tumoral A2780 exhibe características de apoptose (fragmentação nuclear e condensação de cromatina) demonstradas pela coloração com Hoechst 33258. A análise por citometria de fluxo com marcação dupla com anexina V-FITC e Iodeto de propídio confirmou os resultados acima e revelou um grande número de células cancerígenas em apoptose inicial. Para confirmar o tipo de morte celular induzida pelos complexos, verificaram-se os níveis intracelulares das espécies reativas de oxigénio (ROS) e alterações no potencial da membrana mitocondrial. Os resultados demonstraram o envolvimento da via intrínseca da apoptose pela ocorrência da disrupção do potencial da membrana mitocondrial, embora não se tenha verificado qualquer contribuição de ROS na morte de células cancerígenas. A análise dos níveis de expressão das proteínas BAX e BCL-2 e a distribuição subcelular de ambos os complexos sugere que o principal alvo é a mitocôndria. Por outro lado, observou-se a morte celular autofágica induzida por ambos os complexos. O complexo ACP19 parece induzir um ligeiro atraso na progressão do ciclo celular na fase G2/M, ao contrário do complexo SA25 que não mostrou qualquer efeito em comparação com o controlo.

Os estudos de interação com o DNA revelaram os complexos ACP19 e do SA25 interagirem com os sulcos do DNA. Além disso, o ensaio de mobilidade eletroforética demonstra a incapacidade de os complexos desencadear mudanças conformacionais no DNA plasmídico. Ensaio adicionais revelaram uma forte afinidade do complexo ACP19 com as proteínas albumina do soro humano e bovino. Os estudos relativos à proteómica permitiram confirmar a variação dos níveis de proteínas associada a processos de apoptose, de resposta stress e de atividade metabólica. Estes resultados indicam que os complexos estudados são agentes anticancerígenos promissores.

Palavras-chaves: Cancro, Quimioterapia, Complexos de Ruténio(II), Actividade antiproliferativa, mecanismo de ação

## Abstract

Chemotherapy represents a traditional therapeutic approach for the cancer treatment. The high toxicity towards healthy tissues and the intrinsic drug resistance are obstacles that need to be overcome. The development and the identification of new chemotherapeutic agents is critical for further progress in cancer treatment. In this context ruthenium compounds have been recognized as a promising and an effective alternative to platinum drugs approved for clinical use.

The main objective of the present project consists in the evaluation of the antiproliferative potential and the identification of mechanisms of action of the ruthenium complexes bearing a thiosemicarbazone co-ligand of formulation  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  in which bpy is 2,2-bipyridine and HL thiosemicarbazone co-ligand. In particular,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL1})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (ACP19),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL2})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (SA25),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (SA22),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL4})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (SA23), and their ligands, HL1 (TSC-IndNCH<sub>3</sub>), HL2 (TSC-Bztio), HL3 (TSC-OCH<sub>2</sub>) e HL4 (TSC-CH<sub>2</sub>OH). The *in vitro* cell viability assays were performed in A2780 (ovarian carcinoma), HCT116 (colorectal carcinoma), A549 (lung carcinoma) and MCF-7 (breast carcinoma) cell lines. Results showed that the ligands didn't exhibit cytotoxicity with the exception of HL1. Among the complexes evaluated, the complexes ACP19, SA25 and SA23 were shown to have the highest selectivity in A2780 cell line. Therefore, this assays showed that ACP19 and SA25 have a higher cytotoxic effect and selectivity for the A2780 cell line with IC<sub>50</sub> values of 0.5 and 0.6  $\mu\text{M}$ , respectively. For this reason, these complexes were chosen for the evaluation of their mechanism of action.

Ruthenium-treated A2780 cell line exhibited features of apoptosis (nuclear fragmentation and chromatin condensation) demonstrated by Hoechst 33258 staining. Flow cytometry using the double staining annexin V-FITC/Propidium Iodide confirmed these results and revealed a large number of cancer cells in an early stage of apoptosis. To confirm the mechanism of cell death induced by the complexes, the intracellular levels of species reactive of oxygen (ROS) and changes in mitochondrial membrane potential were verified. The obtained results demonstrated the involvement of the intrinsic pathway of apoptosis by the depletion of mitochondrial membrane potential, with no contribution of ROS in cancer cell death. In addition, the analysis of the expression levels of BAX and BCL-2 proteins and the subcellular distribution of both complexes suggest that the main target is mitochondria. In addition, autophagic cell death was observed in both complexes. Further ACP19 was able to induce cell cycle delay in G2/M phase, unlike SA25 which didn't induce any delay.

DNA interaction studies showed that ACP19 and SA25 can interact with DNA through groove-binding. Moreover, the electrophoretic mobility assay revealed that these complexes do not compromise plasmid DNA conformation. Additionally, it was proved that ACP19 exhibited a significant binding to human and bovine serum albumin proteins. The expression levels of proteins associated with apoptosis, stress response and metabolic activity are altered by the action of these complexes, as assessed by proteomic studies. These results demonstrated that the complexes studied are promising anticancer agents.

**Keywords:** Cancer, Chemotherapy, Ruthenium complexes(II), Antiproliferative activity, Mechanism of action

# Índice

|  |      |
|--|------|
| Agradecimentos .....   | I    |
| Resumo .....   | II   |
| Abstract .....   | III  |
| Lista de figuras .....   | VI   |
| Lista de quadros .....   | VIII |
| Símbolos e abreviaturas .....  | IX   |
| 1. Introdução .....  | 1    |
| 1.1. Cancro .....  | 1    |
| 1.1.1. Impacto social: incidência e mortalidade .....  | 1    |
| 1.1.2. Tumorigénese .....  | 2    |
| 1.1.3. Morte celular .....   | 5    |
| 1.1.3.1. Apoptose dependente de caspases .....   | 5    |
| 1.1.3.2. Morte celular autofágica .....  | 8    |
| 1.1.4. Regulação do ciclo celular .....  | 9    |
| 1.2. Terapia do cancro .....   | 11   |
| 1.2.1. Quimioterapia .....   | 12   |
| 1.2.2. Metalofármacos para quimioterapia do cancro .....                                       | 14   |
| 1.2.3. Compostos de ruténio como potenciais metalofármacos para o cancro .....                 | 15   |
| 1.2.3.1. Complexos organometálicos de Ruténio(II) - areno .....                                | 16   |
| 1.2.3.2. Complexos organometálicos de ruténio(II) - ciclopentadienilo .....                    | 17   |
| 1.2.3.3. Complexos de ruténio(II) com ligandos polipiridínicos .....                           | 17   |
| 1.2.3.4. Complexos de ruténio com co-ligandos tiossemicarbazona .....                          | 18   |
| 2. Objetivo .....  | 20   |
| 3. Materiais e Métodos .....   | 22   |
| 3.1. Complexos em estudo .....   | 22   |
| 3.2. Linhas celulares humanas .....  | 23   |
| 3.2.1. Cultura das Linhas tumorais e não-tumorais .....  | 23   |
| 3.2.2. Manutenção das células tumorais .....   | 23   |
| 3.3. Avaliação da viabilidade metabólica .....   | 24   |
| 3.4. Avaliação do potencial apoptótico .....   | 25   |
| 3.4.1. Marcação com a sonda Hoechst 33258 e iodeto de propídio (IP) .....                      | 25   |
| 3.4.2. Marcação com Anexina V – FITC e IP .....  | 26   |
| 3.4.1. Avaliação do efeito dos compostos na morte celular autofágica .....                     | 27   |
| 3.4.2. Avaliação do efeito sobre o potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi M$ ) ..... | 27   |
| 3.4.3. Análise dos níveis das proteínas pró- e anti-apoptóticas por Western Blot .....         | 28   |
| 3.4.3.1. Preparação das amostras .....   | 28   |
| 3.4.3.2. SDS-PAGE e transferência para a membrana de nitrocelulose .....                       | 28   |
| 3.4.3.3. Incubação com anticorpo primário e secundário .....                                   | 29   |
| 3.4.3.4. Exposição do filme .....  | 29   |
| 3.4.4. Detecção da produção intracelular das espécies reativas de oxigénio .....               | 29   |
| 3.5. Localização subcelular .....  | 30   |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 3.6.     | Progressão do ciclo celular .....   | 30 |
| 3.7.     | Estudos in vitro da interação dos complexos com o DNA .....                     | 31 |
| 3.7.1.   | Estudo da clivagem do DNA Plasmídico .....                                      | 31 |
| 3.7.1.1. | Cultura de Escherichia coli e extração do DNA plasmídico .....                  | 31 |
| 3.7.2.   | Espectroscopia de Absorção .....  | 31 |
| 3.7.3.   | Dicroísmo circular .....  | 32 |
| 3.8.     | Interação com a albumina sérica: BSA e HSA .....                                | 33 |
| 3.9.     | Proteómica: eletroforese bidimensional (2-DE) .....                             | 33 |
| 3.9.1.   | Preparação da amostra, precipitação e purificação .....                         | 33 |
| 3.9.2.   | Eletroforese bidimensional (2-DE): Focagem isoelétrica e SDS-PAGE .....         | 34 |
| 3.9.3.   | Revelação dos géis .....  | 35 |
| 3.10.    | Significância estatística .....   | 35 |
| 4.       | Resultados .....  | 36 |
| 4.1.     | Avaliação da viabilidade metabólica .....                                       | 36 |
| 4.2.     | Avaliação do potencial Apoptótico .....   | 39 |
| 4.2.1.   | Marcação com a sonda Hoechst 33258 e IP .....                                   | 39 |
| 4.2.2.   | Marcação com Anexina V-FITC e IP. ....  | 41 |
| 4.2.3.   | Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ M) .....         | 43 |
| 4.2.4.   | Análise dos níveis das proteínas pró- e anti-apoptóticas por Western Blot ..... | 45 |
| 4.2.5.   | Deteção da produção intracelular das espécies reativas de oxigénio .....        | 46 |
| 4.2.6.   | Avaliação do efeito dos compostos na morte celular autofágica .....             | 48 |
| 4.3.     | Localização subcelular .....  | 50 |
| 4.4.     | Progressão do ciclo celular .....   | 51 |
| 4.5.     | Estudos de interação com o DNA .....  | 53 |
| 4.5.1.   | Estudos de clivagem do DNA .....  | 53 |
| 4.5.2.   | Espectroscopia de absorção UV-Vis .....   | 54 |
| 4.5.3.   | Dicroísmo circular .....  | 56 |
| 4.6.     | Interação com a BSA e HSA .....   | 58 |
| 4.7.     | Proteómica .....  | 60 |
| 5.       | Conclusão e Perspetivas futuras .....   | 64 |
| 6.       | Referências .....   | 67 |
| 7.       | Anexos .....  | 78 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1 – Incidência e mortalidade a nível mundial para os principais tipos de cancro. ....   | 2  |
| Figura 1.2 – Esquema representativo das características adquiridas pelas células cancerígenas propostas por Hanahan e Weinberg. ....   | 3  |
| Figura 1.3 – Principais passos na metastização. ....   | 4  |
| Figura 1.4 – Via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (recetores de morte) da apoptose e seus principais reguladores. ....   | 7  |
| Figura 1.5 – Os diferentes estágios da autofagia: a autofagia pode ser induzida por múltiplos estímulos, que têm como alvo o regulador de autofagia, mTOR. ....                                    | 8  |
| Figura 1.6 – Representação das diversas fases do ciclo celular e os complexos CDK/ciclina ativados em cada fase. ....  | 10 |
| Figura 1.7 – Mecanismo gerais de resistência a agentes quimioterapêuticos. ....  | 13 |
| Figura 1.8 – Formula estrutural dos metalofármacos de platina(II) atualmente em uso clínico em quimioterapia: ....   | 14 |
| Figura 1.9 – Estruturas químicas dos agentes antitumorais em ensaios clínicos. ....  | 15 |
| Figura 1.10 – Fórmula estrutural dos complexos com o fragmento “Ru( $\eta^6$ -areno)” ....   | 16 |
| Figura 1.11 – Formula estrutural do a) TM34, [Ru <sup>II</sup> ( $\eta^5$ -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> ) (bpy)(PPh <sub>3</sub> )] [CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ], b) NP309 ..... 17         | 17 |
| Figura 1.12 – Ligandos polipiridínicos utilizados em complexos de ruténio(II). ....  | 18 |
| Figura 1.13 – Fórmula estrutura dos complexos do tipo [Ru(bpy) <sub>2</sub> HL] <sup>2+</sup> sintetizados por Beckgor e colaboradores ..... 18  | 18 |
| Figura 4.1 – Viabilidade celular da linha tumoral A2788 após a exposição de 48 h ao complexo ACP19 (A) e ao complexo SA25 (B). ....  | 38 |
| Figura 4.2 – Viabilidade celular da linha celular de fibroblastos após a exposição de 48 h ao complexo ACP19 (A) e ao complexo SA25 (B). ....  | 38 |
| Figura 4.3 – Células da linha tumoral A2780 marcadas com a sonda Hoechst (fluorescência de excitação e de emissão de 352 e 461nm, respetivamente) para a visualização de núcleos apoptóticos. .... | 40 |
| Figura 4.4 – Percentagem de células com alterações morfológicas na linhagem celular A2780 após exposição ao IC <sub>50</sub> dos complexos. ....   | 41 |
| Figura 4.5 – Quantificação das células HCT116 em apoptose por de citometria de fluxo com a marcação dupla com Anexina-FITC e IP. ....  | 42 |
| Figura 4.6 – Imagens da microscopia de fluorescência do efeito dos complexos no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ M) na linha celular A2780. ....                                  | 44 |
| Figura 4.7 – Rácio de fluorescência verde/vermelho do potencial de membrana mitocondrial. ....   | 44 |
| Figura 4.8 – A) Níveis de expressão de BAX, BCL-2 e PARP em células A2780 pelo complexo ACP19 (no seu IC <sub>50</sub> ). B). Rácio BAX/BCL-2. ....  | 45 |
| Figura 4.9 – A) Níveis de expressão de BAX, BCL-2 e PARP em células A2780 pelo complexo SA25 (no seu IC <sub>50</sub> ). B). Rácio BAX/BCL-2. ....   | 46 |
| Figura 4.10 – Identificação da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) por microscopia de fluorescência. ....  | 47 |
| Figura 4.11 – Produção de espécies reativas de oxigénio (ROS): quantificação da intensidade de fluorescência do corante H <sub>2</sub> DCF-DA na linha celular A2780. ....                         | 47 |
| Figura 4.12 – Imagens da microscopia de fluorescência com dupla marcação com Hoechst 33342 e Cyto-ID® Green. ....  | 49 |
| Figura 4.13 – Percentagem de células com autofagosossomas. ....  | 49 |
| Figura 4.14 – Distribuição subcelular dos complexos ACP19 e SA25 na linha celular A2780. ....  | 50 |
| Figura 4.15 – Efeito dos complexos e do DMSO (veículo, controlo) na progressão do ciclo celular em HCT116. ....  | 52 |



|   |    |
|---|----|
| Figura 4.16 – Efeito do complexo ACP19 no DNA plasmídico pUC18: resultados obtidos com 0,05 % de DMSO (veículo, controlo) e diferentes concentrações de ACP19 (0 a 75 $\mu$ M). .....                           | 54 |
| Figura 4.17 – Efeito do complexo SA25 no DNA plasmídico pUC18: resultados obtidos com 0,05 % de DMSO (veículo, controlo) e diferentes concentrações de SA25 (0 a 100 $\mu$ M). .....                            | 54 |
| Figura 4.18 – Variação da absorvância do complexo ACP19 (A) e SA25 (B) (25 $\mu$ M) na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (10 a 100 $\mu$ M). .....   | 55 |
| Figura 4.19 – Representação de Benesi-Hildebran para o cálculo de das constantes de afinidade dos complexos ACP19 (A) e SA25 (B) para com o DNA (K <sub>b</sub> ). .....  | 56 |
| Figura 4.20 – Espectro CD da interação do ACP19 com CT-DNA em tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl, pH 7,0 com incubação de 6h a 37°C. ....  | 57 |
| Figura 4.21 – Espectro de absorção da formação do complexo {ACP19-BSA} por espectroscopia UV-Vis. ....  | 58 |
| Figura 4.22 - Espectro de absorção da formação do complexo {ACP19-HSA} por espectroscopia UV-Vis. ....  | 59 |
| Figura 4.23 – Representação de Benesi-Hildebran para o cálculo de K <sub>b</sub> para o complexo {ACP19-BSA} (esquerda, incubados durante 24h a 37°C) e {ACP19-HSA} (direita, incubados durante 24h a 37°C). .. | 59 |
| Figura 4.24 – Diferenças no nível da expressão das proteínas na linha tumoral A2780 exposta ao ACP19 comparando com o controlo. ....  | 60 |
| Figura 4.25 – Géis resultantes de eletroforese bidimensional de extratos proteicos de células tumorais A2780. ....  | 61 |

## Lista de quadros

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1.1: Principais grupos de agentes quimioterapêuticos, discriminado os principais agentes e o seu mecanismo de ação.....   | 12 |
| Tabela 3.1 – Propriedades dos compostos utilizados no presente trabalho.....   | 22 |
| Tabela 3.2 – Linhas celulares utilizadas e as suas características (fonte, morfologia celular e meio de cultura). ....   | 23 |
| Tabela 3.3 – Programa utilizado na focagem isoeletrica (IEF) .....   | 34 |
| Tabela 4.1 – Atividade citotóxica, quantificada como IC <sub>50</sub> relativo para os complexos e ligandos em estudo, nas linhas celulares A2780, HCT116, A549, MCF-7 e fibroblastos. ....  | 37 |
| Tabela 4.2 – Índices de seletividade (IS) dos complexos ACP19, SA25 e SA22 nas linhas tumorais estudadas. ....   | 39 |
| Tabela 4.3 – Percentagem de células viáveis, células em apoptose inicial e tardia e células necróticas após a incubação de células HCT116 com 0,1% (v/v) de DMSO (controlo) ou com os respectivos IC <sub>50</sub> dos complexos. .... | 42 |
| Tabela 4.4 – Fração de células HCT116 (em %), na fase G1/G0, S e G2/M, quando exposta ao IC <sub>50</sub> do complexo e a 0,1% (v/v) de DMSO (veículo, controlo).....  | 51 |
| Tabela 4.5 – Proteínas identificadas nos géis resultantes de eletroforese bidimensional com a identificação da variação de expressão relativamente ao controlo.....  | 61 |
| Tabela 5.1 – Resumo dos efeitos observados nos ensaios biológicos realizados pelos complexos ACP19 e SA25 na linha tumoral A2780. ....   | 64 |

## Símbolos e abreviaturas

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>A2780</b>           | Linha celular de adenocarcinoma do ovário  |
| <b>A549</b>            | Linha celular do carcinoma do pulmão   |
| <b>APS</b>             | Persulfato de amônio, do inglês <i>Ammonium Persulfate</i>                           |
| <b>APAF-1</b>          | <i>Apoptosis protease activating factor-1</i>  |
| <b>BAX</b>             | <i>Bcl-2-associated X protein</i>  |
| <b>BCL-2</b>           | <i>B-cell lymphoma protein 2</i>   |
| <b>Bid</b>             | <i>BH3-interacting domain death agonist</i>  |
| <b>Bpy</b>             | 2,2-bipiridina   |
| <b>BSA</b>             | Albumina do soro bovino, do inglês <i>Bovine serum albumin</i>                       |
| <b>Caspase</b>         | Protease de cisteína, do inglês <i>Cysteine-aspartic protease</i>                    |
| <b>CD</b>              | Dicroísmo Circular   |
| <b>CDKs</b>            | <i>Cyclin-dependent protein kinases</i>  |
| <b>CHAPS</b>           | 3-[(3-cloramidopropil) dimetilamonio]-1 propanosulfonato                             |
| <b>CKI</b>             | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>   |
| <b>CT-DNA</b>          | DNA de timo de bezerro, do inglês <i>Calf Thymus-DNA</i>                             |
| <b>DCF</b>             | <i>2,7-dichlorofluorescein</i>   |
| <b>DISC</b>            | <i>Death inducing signalling complex</i>   |
| <b>DMEM</b>            | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>  |
| <b>DMSO</b>            | Sulfóxido de dimetilo, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>                           |
| <b>DNA</b>             | Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>                    |
| <b>DOX</b>             | Doxorrubicina  |
| <b>DR, DRS</b>         | Recetores de morte   |
| <b>DTT</b>             | Ditiotreitol   |
| <b>E2F</b>             | Fator de transcrição E2, do inglês <i>E2 transcription factor</i>                    |
| <b>FADD</b>            | <i>Fas-associated death domain</i>   |
| <b>FBS</b>             | Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>                               |
| <b>FITC</b>            | Isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>           |
| <b>HCT116</b>          | Linha celular do carcinoma colorectal humano   |
| <b>H2DCF-DA</b>        | <i>2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>                                      |
| <b>HSA</b>             | Albumina do soro humano, do inglês <i>Human serum albumin</i>                        |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | concentração de composto para o qual existe redução da viabilidade celular para 50%  |
| <b>ICP-MS</b>          | <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>                                  |
| <b>IEF</b>             | Focagem Isoelétrica  |
| <b>IP</b>              | Iodeto de Propídio, do inglês <i>Propidium Iodide</i>                                |
| <b>IPG</b>             | Gradiente de pH imobilizado  |
| <b>JC-1</b>            | <i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimi-dazolyl-carbocyanine iodide</i> |
| <b>Kb</b>              | Constante de ligação   |
| <b>LB</b>              | <i>Luria-Bertani liquid medium</i>   |
| <b>MCF-7</b>           | Adenocarcinoma humano da mama hormono-dependente ER+(α)                              |
| <b>MDR</b>             | Resistência a múltiplos compostos (do inglês, <i>Multiple Drug Resistance</i> )      |
| <b>MTS</b>             | (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) |
| <b>PBS</b>             | Tampão de Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>                 |
| <b>pDNA</b>            | DNA plasmídico   |
| <b>PFA</b>             | Paraformaldeído  |
| <b>PMSF</b>            | Flureto de fenilmetilsulfonilo, do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>       |
| <b>RB</b>              | Proteína do retinoblastoma, do inglês <i>Retinoblastoma</i>                          |
| <b>RNA</b>             | Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>                                |
| <b>ROS</b>             | Espécies Recativas de Oxigénio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>             |
| <b>RPMI</b>            | Roswell Park Memorial Institute culture medium                                       |
| <b>SDS</b>             | Dodecil sulfato de sódio   |
| <b>SDS-PAGE</b>        | Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio                     |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>SMAC/DIABLO</b>               | <i>Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI</i> |
| <b>SPR</b>                       | <i>Surface Plasmon Resonance</i>   |
| <b>TAE</b>                       | Ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid</i>                                     |
| <b>TEM</b>                       | Microscopia de transmissão eletrônica  |
| <b>TEMED</b>                     | N,N,N',N' - tetrametiletenodiamina   |
| <b>TNF</b>                       | Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>                               |
| <b>TNFR1</b>                     | Recetor do fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>         |
| <b>TSC</b>                       | Tiosemicarbazona   |
| <b><math>\epsilon</math></b>     | Coeficiente de extinção molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ )  |
| <b><math>\epsilon_a</math></b>   | Coeficiente de extinção molar aparente   |
| <b><math>\epsilon_b</math></b>   | Coeficiente de extinção molar do complexo ligado   |
| <b><math>\epsilon_f</math></b>   | Coeficiente de extinção molar do complexo livre  |
| <b><math>\ell</math></b>         | Percurso ótico   |
| <b><math>\Delta\Psi M</math></b> | Potencial da membrana mitocondrial   |

# 1. Introdução

## 1.1. Cancro

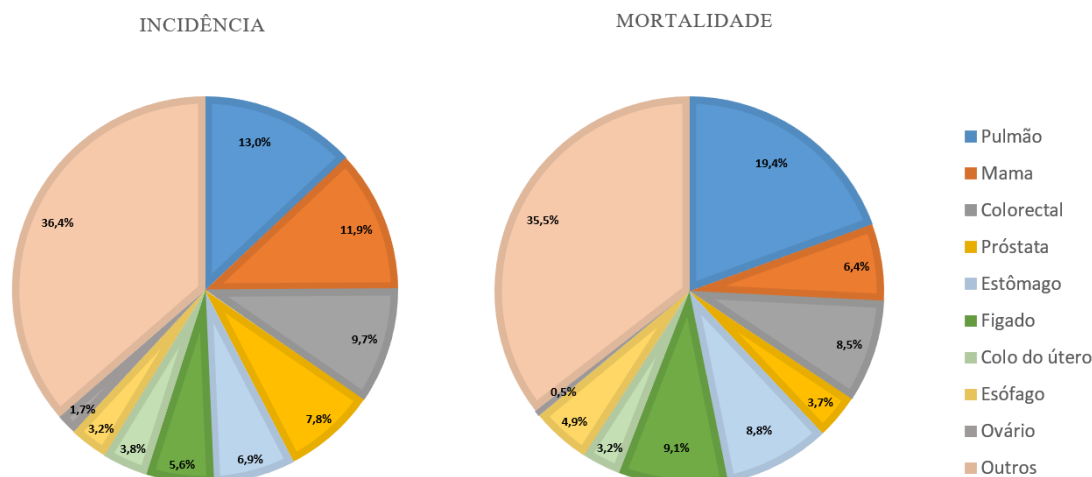
O cancro é uma doença caracterizada por um crescimento descontrolado das células, excedendo os seus limites normais, podendo estas células invadir órgãos adjacentes e espalhar-se pelo corpo (Pecorino 2012; Risbey n.d.). Esta proliferação descontrolada resulta de alterações estruturais e quantitativas nas moléculas que controlam diferentes aspetos do comportamento celular (Dong 2006). De acordo com a origem do tecido podemos distinguir os diferentes tipos de cancro: carcinomas (células epiteliais), sarcomas (células do mesoderme) e o adenocarcinomas (tecido glandular) (Pecorino 2012; Soediono 2007).

### 1.1.1. Impacto social: incidência e mortalidade

O cancro é a segunda causa de morte em todo o mundo, principalmente na Europa e nos Estados Unidos (Millimouno *et al.* 2014; Pinto *et al.* 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) 8,8 milhões de pessoas morreram de cancro em 2015 e é estimado que o número de casos aumente em 70% nas próximas duas décadas. Este aumento é uma consequência do crescimento da população esperado e da esperança média de vida. Estatísticas do NHI (*National Health Institute*, Estados Unidos) indicam que em cada 5 pessoas nascidas hoje, 2 serão diagnosticadas com cancro em alguma altura da sua vida e 1 delas efetivamente sucumbirá à doença ( *SEER Cancer Statistics Review 1975-2014*)

Durante o desenvolvimento do cancro existe um longo período de latência e uma alta incidência na sua progressão. Apenas 5 a 10% de todos os casos de cancro podem ser atribuídos a mutações genéticas na linha germinal, e portanto hereditárias, enquanto que os restantes 90% a 95% estão associados a mutações somáticas em oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparação do DNA, promovidas por alterações epigenéticas e genéticas que ocorrem no progresso tumoral (Bergers *et al.* 2003; Gupta & Massagué 2006). Os fatores ambientais ou o estilo de vida também podem ser a causa do desenvolvimento tumoral (Anand *et al.* 2008). Os fatores relacionados com o estilo de vida incluem, o tabaco, consumo de álcool, dieta, poluentes ambientais, infeções, stress, obesidade e radiação UV (Risbey n.d.; Pecorino 2012).

A incidência da maioria dos cancros varia mundialmente, sendo o cancro da mama, da próstata, do colorectal, dos pulmões e dos ovários mais frequentes nos países mais desenvolvidos (WHO 2017). No entanto, o cancro do pulmão, do estômago e do fígado são os responsáveis por uma maior taxa de mortalidade a nível mundial (GLOBACAN 2008).



**Figura 1.1 – Incidência e mortalidade a nível mundial para os principais tipos de cancro.** Dados referentes a 2008 (Adaptado de GLOBOCAN, 2008).

Até 2020 é esperado que a população mundial aumente até aos 7,5 biliões, onde serão diagnosticados 15 milhões de novos casos (Anand *et al.* 2008). Apesar dos efeitos positivos que a prevenção tem vindo a demonstrar, o cancro é uma condição muito abrangente e com grande impacto social. Portanto é necessário compreender os mecanismos por detrás do cancro e estabelecer estratégias para o poder combater de forma eficiente.

O cancro do ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum nos países desenvolvidos (Nezhat *et al.* 2015). Na Europa, é a quinta neoplasia mais frequente na mulher, sendo a primeira causa de morte entre os tumores ginecológicos. O cancro do ovário epitelial, que corresponde a 90% dos tumores malignos do ovário, é altamente heterogéneo, podendo ser dividido em vários sub-tipos histológicos: seroso, mucinoso, endometrióide, de células de transição e células-claras (Webb & Jordan 2016; Agarwal & Kaye 2003). A maioria dos cancros de ovário encontram-se em estadios avançados no momento do diagnóstico tendo um mau prognóstico quando comparado com os carcinomas em fase inicial (Colombo *et al.* 2010; Webb & Jordan 2016).

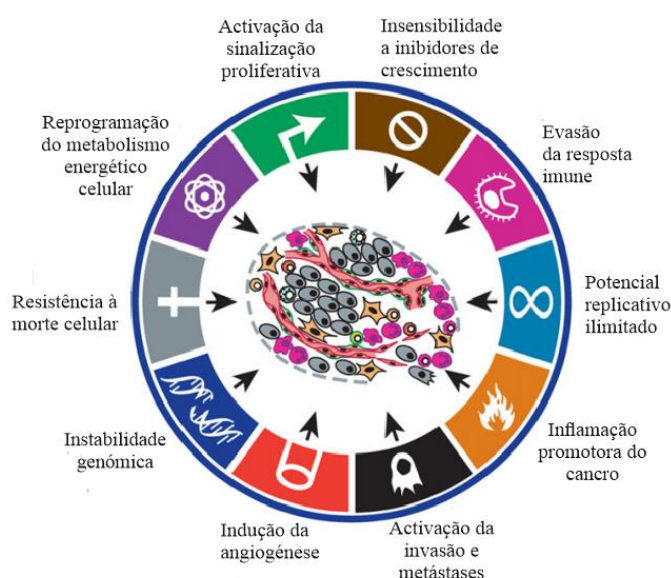
Os fatores de risco deste tipo de cancro incluem a idade, a história familiar associada às neoplasias e mutações herdadas nos genes BRCA (Pal *et al.* 2005). No entanto, essas mutações também são comuns em mulheres com cancro dos ovários que não possuam uma história familiar de cancro (Alsop *et al.* 2012). Os portadores da mutação BRCA1 têm um risco de 40% de desenvolver cancro dos ovários aos 70 anos, enquanto que os portadores da mutação BRCA2 têm 20%. A maioria dos tumores com mutações nos genes BRCA são tumores serosos de alto grau (Webb & Jordan 2016; Pal *et al.* 2005). A remoção dos ovários e das trompas de Falópio nas mulheres com estas mutações diminui o risco de cancro dos ovários. Outros riscos associados ao cancro do ovário incluem a doença inflamatória pélvica e a síndrome de Lynch. O uso de estrogénio sozinho e combinado com progesterona pode aumentar o risco, assim como o tabaco, enquanto que a gravidez e o uso prolongado de contraceptivos pode ajudar a reduzir o risco (Society 2017; Pal *et al.* 2005).

### 1.1.2. Tumorigénese

O cancro surge por meio de um processo mutagénico em que as células adquirem um conjunto de características fenotípicas particulares (Hahn & Weinberg 2002; Hanahan & Weinberg 2011; Luo *et*

al. 2009). Hanahan e Weinberg definiram as seis características comuns das células cancerígenas: i) proliferação independente de sinais mitogénicos; ii) insensibilidade aos inibidores do crescimento celular; iii) evasão da apoptose; iv) potencial replicativo ilimitado; v) indução de angiogénese (formação de novos vasos sanguíneos de forma a obterem oxigénio e nutrientes essenciais para a sua sobrevivência e expansão; vi) capacidade de invasão e metastização (invasão do tecido adjacente e migração para tecidos distantes) (Hanahan & Weinberg 2000; Hanahan & Weinberg 2011).

Mais recentemente, Hanahan e Weinberg alteraram o conceito e adicionaram dois processos que são considerados como marcas emergentes: i) capacidade de evadir a resposta imune do hospedeiro; ii) alteração do metabolismo energético celular. Além disso, definiram duas características que promovem a transformação celular e a progressão do tumor: instabilidade genómica e a inflamação promotora de cancro (Figura 1.2). (Hanahan & Weinberg 2011; Pecorino 2012).



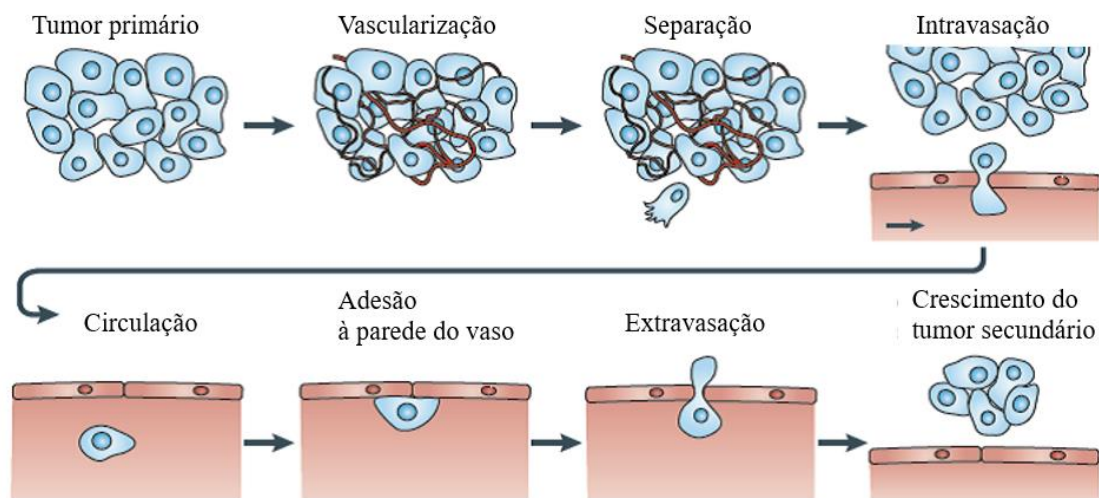
**Figura 1.2 – Esquema representativo das características adquiridas pelas células cancerígenas propostas por Hanahan e Weinberg.** (Adaptado de Hanahan & Weinberg 2011).

A tumorigénese ocorre através de alterações da regulação celular, sendo desencadeada por mutações em dois tipos principais de genes: proto-oncogenes e genes supressores de tumores (Lodish 2000; Mendelsohn & Gray 2014; Ashkenazi *et al.* 2008). Os proto-oncogenes são ativados para se tornarem oncogenes através de mutações de ganho de função e aumento dos produtos de expressão na progressão tumoral (Lodish 2000; Pecorino 2012; Bertram 2001). Os genes supressores de tumores codificam proteínas que têm um papel importante na inibição do crescimento e do desenvolvimento tumoral sendo inativados por mutações de perda de função (Bertram 2001; Pecorino 2012). O equilíbrio entre o crescimento celular, a diferenciação e a apoptose afeta o número de células do corpo, sendo que a desregulação destes processos pode desencadear a progressão tumoral até ao aparecimento de uma neoplasia maligna (Pecorino 2012; Hanahan & Weinberg 2000; Mendelsohn & Gray 2014).

Quando ocorrem danos genéticos numa célula somática, pela divisão celular essa mutação será transmitida às células filhas. No entanto, uma única mutação não conduz ao aparecimento de um tumor. É necessário que ocorram uma série de mutações em múltiplos genes que controlam processos chave tais como os referidos por Hanahan & Weinberg (2000, 2011) e que desencadeiam uma proliferação descontrolada, invasão de tecidos adjacentes e metastização (Mendelsohn & Gray 2014; Pecorino 2012).

O processo de metastização consiste numa longa série de etapas sequenciais e inter-relacionadas cujo resultado é dependente das propriedades intrínsecas das células tumorais e da resposta do hospedeiro (Fidler 2003; Chambers 2002; Pecorino 2012). Durante o seu crescimento, o tumor primário necessita de um grande aporte de nutrientes e oxigénio conseguido pela formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese). Durante a angiogénese várias substâncias pró-angiogénicas tais como o fator crescimento de células endoteliais vasculares (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), ligam-se a recetores específicos (VEGFR, do inglês *vascular endothelial growth factor receptors*), promovendo a proliferação das células endoteliais e a remodelação da matriz extracelular (MEC) (Cao *et al.* 2015). A remodelação da MEC envolve enzimas - metaloproteinases da matriz (MMPs), que atuam diretamente sobre os componentes da membrana basal (MB), que separa o epitélio do tecido conjuntivo, e que representa a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células epiteliais neoplásicas (Deryugina & Quigley 2006). A degradação da MB e a formação destes novos vasos sanguíneos ajudam a intravasão (via pela qual as células tumorais entram no sistema circulatório/linfático) permitindo a disseminação ganglionar regional (micrometástases linfonodos) ou mesmo a disseminação à distância (Fidler 2003; Pecorino 2012).

As células necessitam de sobreviver na circulação até chegarem ao novo órgão, para posteriormente extravasarem da circulação para o tecido circundante, onde irão iniciar o crescimento e desenvolver micrometástases no novo local. O crescimento das micrometástases é igualmente suplementado pelo recrutamento de novos vasos sanguíneos permitindo o seu crescimento e originando um tumor secundário macroscópico. (Chambers 2002; Fidler 2003; Pecorino 2012) (Figura 1.3).



**Figura 1.3 – Principais passos na metastização.** Neste processo as células separam-se do tumor primário vascularizado, ocorrendo posteriormente a intravasão. Algumas destas células aderem às paredes dos vasos sanguíneos podendo extravasar levando ao crescimento do tumor secundário (Adaptado de Wirtz *et al.* 2011).

A teoria proposta por Stephen Paget “*seed and soil*” dita, que o crescimento secundário de células neoplásicas (*the seed*) é dependente da “competência” do órgão distal (*the soil*), ou seja, é necessário um microambiente que detenha as características propícias ao desenvolvimento de populações de células tumorais advindas de um local primário (Zijl *et al.* 2011; Psaila & Lyden 2009). Por exemplo, em pacientes com carcinoma colorectal há uma tendência de o cancro metastizar para o fígado (Chambers 2002).

Além da ação do tumor primário no local específico, a formação de metástases é influenciada por uma grande quantidade de restrições biológicas, químicas e fisiológicas (Zijl *et al.* 2011). Dentro das



barreiras químicas extrínsecas salienta-se o pH, as espécies reativas de oxigénio (ROS) ou a hipoxia; no que respeita aos fatores biológicos o microambiente celular tem um papel crucial regulando a disseminação tumoral pela presença de determinadas citocinas, quimiocinas e MMPs. As restrições fisiológicas incluem a tensão intratumoral, a composição da membrana e a anatomia das paredes dos capilares. As diferenças anatómicas, e a densidades dos vasos linfáticos ou sanguíneos tem um grande impacto na disseminação do tumor em locais mais distantes (Zijl *et al.* 2011; Chambers 2002; Gupta & Massagué 2006).

Sendo o cancro uma consequência de uma desregulação grave entre processos de morte e crescimento celular, interessa conhecer com mais pormenor alguns destes processos-chave. Desta forma, os próximos subcapítulos são destinados à morte celular e à regulação do ciclo celular

### 1.1.3. Morte celular

O equilíbrio entre sobrevivência e morte é essencial para a sobrevivência da célula. O nascimento e a morte de uma célula cancerígena depende de várias vias de morte celular (Galluzzi *et al.* 2012).

Segundo o comité de nomenclatura em morte celular (NCCD, *Nomenclature Committee on Cell Death*), é necessário melhorar a classificação da morte celular (Galluzzi *et al.* 2014; Galluzzi *et al.* 2012). Durante os últimos anos, várias recomendações foram publicadas, nomeadamente discriminando a morte celular em: 1) morte celular accidental (ACD, *Accidental Cell Death*), causada por vários estímulos, incluindo físicos (temperaturas e pressões elevadas), químicos (detergentes potentes ou variações extremas de pH) e mecânicos (levando à perda da integridade celular) (Galluzzi *et al.* 2014) em que a forma mais comum de ACD é a necrose (perda da integridade da membrana plasmática, organelos e lise celular; geralmente associada a inflamação) (Ashkenazi & Salvesen 2014); e 2) morte celular regulada (RCD, *Regulated Cell Death*), envolvendo uma maquinaria celular complexa conduzindo a uma morte celular programada (Galluzzi *et al.* 2014; Ashkenazi & Salvesen 2014) onde se inclui a apoptose dependente de caspases, que tem um papel fundamental no desenvolvimento embrionário e na homeostase do tecido adulto (Galluzzi *et al.* 2014; Elmore 2007).

Existe uma grande variedade de tipos de morte celular regulada, como morte celular autofágica, necroptose, pironectia, apoptose dependente de caspases, entre outros (Galluzzi *et al.* 2012; Ashkenazi & Salvesen 2014). O foco deste trabalho será no processo apoptótico dependente de caspase e a morte celular autofágica.

#### 1.1.3.1. Apoptose dependente de caspases

A apoptose é um processo fisiológico programado de morte celular que desempenha um papel importante no desenvolvimento da morfogénese, onde ajuda a eliminar as células do corpo que não são necessárias ou que se encontram danificadas (Pecorino 2012; Ashkenazi 2008). Atualmente, muitas das terapias contra o cancro exercem o seu efeito desencadeando o mecanismo de apoptose em células cancerígenas. Desta forma, o conhecimento deste mecanismo vai permitir definir novos alvos terapêuticos (Fulda & Debatin 2006).

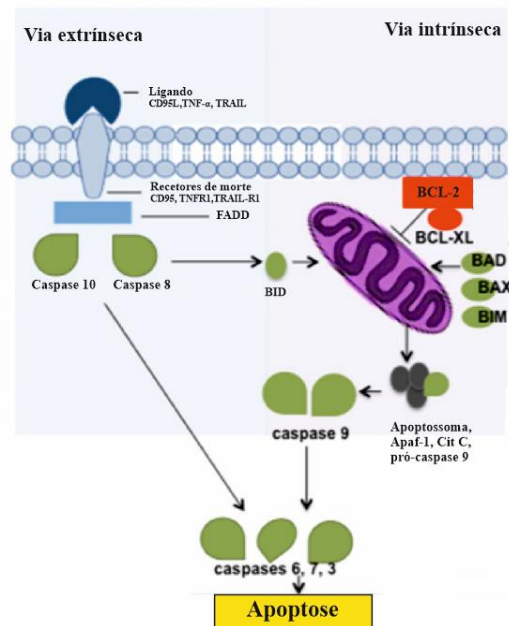
A regulação do mecanismo de apoptose é um fator patológico importante numa grande variedade de doenças. Falhas neste mecanismo podem levar ao desenvolvimento e progressão do tumor, sendo que muitas células cancerígenas exibem uma significativa resistência à sinalização da apoptose (Sayers 2011; Elmore 2007). A apoptose pode ser desencadeada por diversos factores de stress intracelulares, incluindo danos no DNA, stress oxidativo, sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, acumulação de proteínas no

retículo endoplasmático, agentes quimioterápicos, entre outros (Galluzzi *et al.* 2012; Fulda & Debatin 2006).

Durante o processo de apoptose a célula sofre alterações morfológicas caracterizadas por diminuição de volume celular, por protusões na membrana plasmática, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e degradação endonucleocítica do DNA em fragmentos nucleossômicos (Hu & Kavanagh 2003; Sayers 2011; Fulda & Debatin 2006). Estas alterações celulares ocorrem após uma cascata de sinalização celular e eventos mediados por caspases, que regulam as proteínas pró-apoptóticas e as proteínas anti-apoptóticas (Hu & Kavanagh 2003; Sayers 2011). As caspases (proteases de cisteína) são expressas na forma de pró-enzima inativa na maioria das células e, uma vez ativada, podem ativar outras pró-caspases, permitindo a iniciação da cascata proteolítica. Esta cascata, na qual uma caspase pode ativar outras, amplifica a via de sinalização apoptótica e conduz à morte celular (Fulda & Debatin 2006; Elmore 2007). Estas proteínas podem clivar os componentes celulares que são necessários para o funcionamento normal celular, incluindo proteínas estruturais do citoesqueleto e proteínas nucleares (Hassan *et al.* 2014).

A ativação das caspases pode ser iniciada através de duas vias principais: A via extrínseca ou de recetor de morte celular e a via intrínseca ou mitocondrial (Ichim & Tait 2016; Hu & Kavanagh 2003). Ambas as vias levam à ativação de caspases e à clivagem de específicos substratos celulares. A via extrínseca recebe sinais através da ligação de ligandos a recetores de morte pró-apoptóticos (DRs), tais como CD95, TNF, TRAIL. Por contraste, a via intrínseca é ativada por eventos intracelulares induzidos por terapia de radiação, quimioterapia, fatores pró-apoptóticos do mitocôndria, apoptossoma e por caspases efectoras (Figura 1.4) (Ichim & Tait 2016; Sayers 2011). Ambas as vias ativam a cascata enzimática de caspase, que realiza um número de eventos proteolíticos que medeiam o programa de morte celular (Ashkenazi 2008).

A via extrínseca envolve interações mediadas por recetores de morte (DRs), pertencentes à família TNF (do inglês *tumor necrosis factor*), que consiste em mais de 20 proteínas com uma ampla gama de funções biológicas, incluindo regulação da morte celular, diferenciação celular, ou regulação imune (Hassan *et al.* 2014; Fulda & Debatin 2006). Os membros da família dos recetores TNF compartilham domínios extracelulares de cisteína e apresentam um domínio citoplasmático com cerca de 80 aminoácidos, denominado por “*domínio de morte*”, que desempenha um papel fundamental na transmissão do sinal de morte, a partir da superfície da célula, para as vias de sinalização intracelulares (Fulda & Debatin 2006; Elmore 2007). Os recetores de morte mais bem caracterizados incluem o CD95 (APO-1/Fas), o recetor TNF1 (TNFR1), o TRAIL-R1 e o TRAIL-R2. Os ligandos correspondentes da família TNF compreendem ligandos de recetor de morte, tais como, ligando CD95 (CD95L), TNF- $\alpha$  e TRAIL (Fulda & Debatin 2006). A estimulação dos recetores de morte da família TNF pelos respetivos ligandos resulta na agregação do recetor e o recrutamento da molécula adaptadora Fas (FADD) e da caspase-8. O complexo DISC (do inglês, *death inducing signaling complex*), formado pelo ligando, recetor e adaptador, ativa a caspase iniciadora 8, que inicia a apoptose por clivagem direta das caspases efectoras a jusante, como a caspase 3 (Fulda & Debatin 2006; Ashkenazi 2008; Hu & Kavanagh 2003).



**Figura 1.4 – Via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (recetores de morte) da apoptose e seus principais reguladores.** Os reguladores pró-apoptóticos estão representados a verde e os anti-apoptóticos estão indicados a vermelho. (Giussani *et al.* 2014).

A via intrínseca ou mitocondrial envolve uma variedade de estímulos não mediados por recetores que produzem sinais intracelulares atuando diretamente no mitocôndria, como é o caso da radiação, toxinas, hipoxia, hipertermia, infeções virais, e radicais livre (Elmore 2007). Todos estes estímulos causam alterações na membrana mitocondrial interna que resulta numa abertura do poro de transição de permeabilidade (MPT) (Elmore 2007).

As proteínas da família BCL-2 têm um papel central no controlo da via mitocondrial. Com mais de 20 membros identificados, esta família inclui proteínas supressores da apoptose (BCL-2, BCLX1, MCL1, A1, BLCW e BCLGG) e proteínas que promovem a apoptose (BAX, BAK, BOK, BAD, BID, BIK e BIM1) (Ichim & Tait 2016; Hu & Kavanagh 2003). A libertação de citocromo c pela mitocôndria é regulada pelas proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas desta família, tendo um papel principal na regulação do mecanismo desta via (Hu & Kavanagh 2003). O citocromo c liga-se à APAF-1 (do inglês, *apoptosis protease activating factor-1*), uma proteína ativadora de caspase que oligomeriza após ligação ao citocromo c, formando um complexo – o apoptossoma. O apoptossoma recruta a pró-caspase 9, através da interação com seu domínio de recrutamento de caspase (CARD), levando à ativação da caspase 9 e que, por sua vez, ativa a caspase 3 (Hu & Kavanagh 2003; Hassan *et al.* 2014).

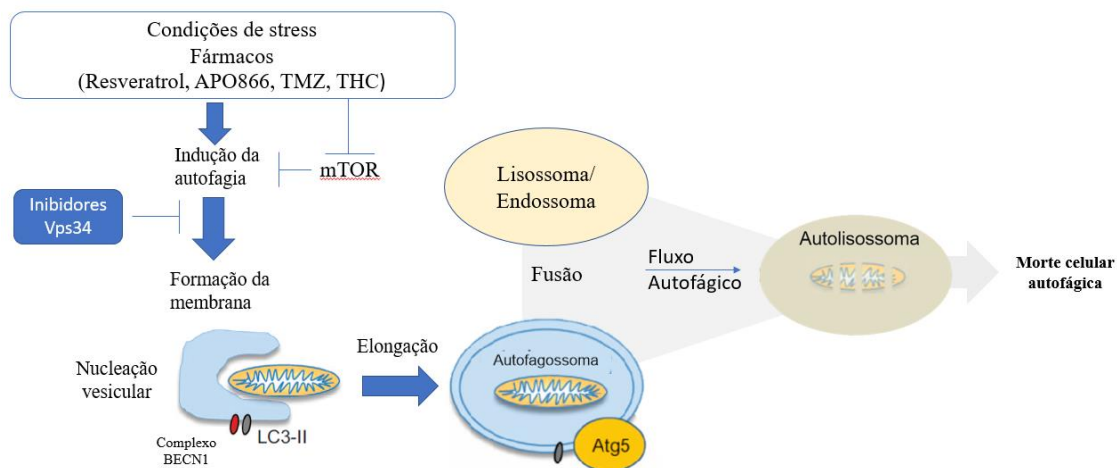
Além do citocromo c, o mitocôndria também liberta endonucleases G, AIF (*apoptosis induction factor*, fator de indução de apoptose), Smac/DIABLO (do inglês, *second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI*) e HtrA2/Omi (do inglês, *Omi/high temperature requirement protein A*) que promovem a apoptose pela inibição do IAP (inibidores de proteína de apoptose) (Fulda & Debatin 2006; Hassan *et al.* 2014).

Os membros da família BCL-2 formam canais que facilitam o transporte e a interação com proteínas do mitocôndria, que podem levar à indução da rutura da membrana mitocondrial externa. A sobre-expressão da proteína BCL-2 previne a morte celular induzida por agentes anticancerígenos e contribui para a resistência a fármacos em pacientes com alguns tipos de cancro (Hu & Kavanagh 2003).

Entre as vias extrínseca e intrínseca pode existir um *crosstalk* promovido pela clivagem da caspase-8 que ativa a proteína BID (do inglês, *BH3 interacting domain death agonist*), pertencente à família de proteínas BCL-2. A sua ativação promove a ativação da proteína BAX que leva à libertação do citocromo c da mitocôndria (Ichim & Tait 2016; Elmore 2007; Hu & Kavanagh 2003).

### 1.1.3.2. Morte celular autofágica

A autofagia é um processo de auto-degradação que é essencial para a sobrevivência, diferenciação, desenvolvimento e homeostase (Kourtis & Tavernarakis 2009; Denton *et al.* 2011). A capacidade da autofagia reciclar nutrientes, manter a homeostase celular e degradar constituintes citoplasmáticos tóxicos ajuda a manter as células vivas durante a privação de nutrientes e outras condições de stress (Kroemer & Levine 2008). A Autofagia é um mecanismo catabólico e altamente regulado (por alguns genes relacionados à autofagia, Atgs) (Ouyang *et al.* 2012; Shen & Codogno 2011), podendo ser induzida por múltiplos estímulos, incluindo em resposta ao stress metabólico, disfunção de organelos e agregação de proteínas por vários agentes anticancerígenos, muitos dos quais tem como alvo o regulador central da autofagia, mTOR (Ouyang *et al.* 2012; Fulda & Kögel 2015).



**Figura 1.5 – Os diferentes estágios da autofagia: a autofagia pode ser induzida por múltiplos estímulos, que têm como alvo o regulador de autofagia, mTOR.** A nucleação do autofagossoma requer a Vps34 (do inglês *class-III phosphatidylinositol-3-kinase*) e a Beclina-1/ ATG6 para recrutar proteínas e os lípidos necessários para a formação do autofagossoma. A elongação é mediada por dois sistemas tipo de conjugação de ubiquitina, que resulta na ligação do LC3-II à membrana do autofagossoma. Após o fecho da vesícula, o autofagossoma maduro funde-se com o lisossoma formando o autolisossoma (Adaptado de Fulda & Kögel 2015).

Durante a autofagia os constituintes celulares, como os organelos citoplasmáticos, estão envolvidos em vesículas citoplasmáticas de membrana dupla, chamados autofagossomas (Denton *et al.* 2011). A nucleação vesicular é promovida por um complexo macromolecular que contém a cinase lipídica Vps34 (Complexo BECN1). A Beclina-1 pode ativar Vps34 levando à formação do PtdIns3P, que é necessário para a fase da nucleação. A elongação da vesícula é regulada por dois sistemas de conjugação de ubiquitina tipo, que envolve vários tipos de proteínas ATG: i) um complexo proteico contendo Atg5 (Atg12/Atg16); ii) a conjugação de uma fosfatidiletanolamina com LC3-I mediada pela ATG7/ATG3, levando à formação da LC3-II, que é inserida na membrana do autofagossoma. (Fulda & Kögel 2015). Após o fecho da vesícula, o autofagossoma maduro funde-se com os lisossomas ou endossomas para formarem o autolisossoma, em que o seu conteúdo vesicular é digerido por proteases lisossomais (Figura 1.5) (Fulda & Kögel 2015; Tsujimoto & Shimizu 2005).

A ativação excessiva da via autofágica pode levar a uma morte celular dependente da autofagia (Fulda & Kögel 2015). Portanto, ao analisar a relação entre morte celular e o cancro, é importante determinar se a autofagia induz a sobrevivência celular ou se contribui para a morte celular (Denton *et al.* 2011; Ouyang *et al.* 2012). Os autores Shen e Codogno propuseram os seguintes critérios para definir a morte celular por autofagia: i) a morte celular ocorre independentemente da apoptose, ou seja, sem a ativação das caspases; ii) existe um aumento do fluxo autofágico, e não apenas um aumento de marcadores de autofagia; iii) é possível fazer a supressão da autofagia usando meios genéticos (ex: o knockout/mutação de genes ou utilizando RNAi que atua em moduladores autofágicos, como o AMBRA1, ATG6, ATG12 ou Beclina1) e usando inibidores químicos (agentes que têm como alvo Vps34, com capacidade para prevenir a morte celular) (Shen & Codogno 2011; Galluzzi *et al.* 2012).

Atualmente, foram feitos consideráveis avanços no entendimento do duplo papel da autofagia na sobrevivência celular e na morte celular. Por um lado, a ausência de uma regulação rigorosa da via autofágica pode exceder o limiar e causar o catabolismo de fatores citoplasmáticos, moléculas reguladoras e organelos que são essências para a sobrevivência. Além disso, a autofagia pode acelerar a destruição de células apoptóticas, através da iniciação da auto-digestão de células destinadas a morrer (Kourtis & Tavernarakis 2009).

O facto de a autofagia estar envolvida como parte da resposta anti-tumoral para terapias citotóxicas, destaca a relevância deste mecanismo no tratamento dos vários tipos de cancro. Portanto, torna-se fundamental conhecer os mecanismos associados à morte autofágica para desenvolver novos agentes anticancerígenos que interfiram com as vias de sinalização da autofagia de forma a torná-la uma morte celular programada.

#### 1.1.4. Regulação do ciclo celular

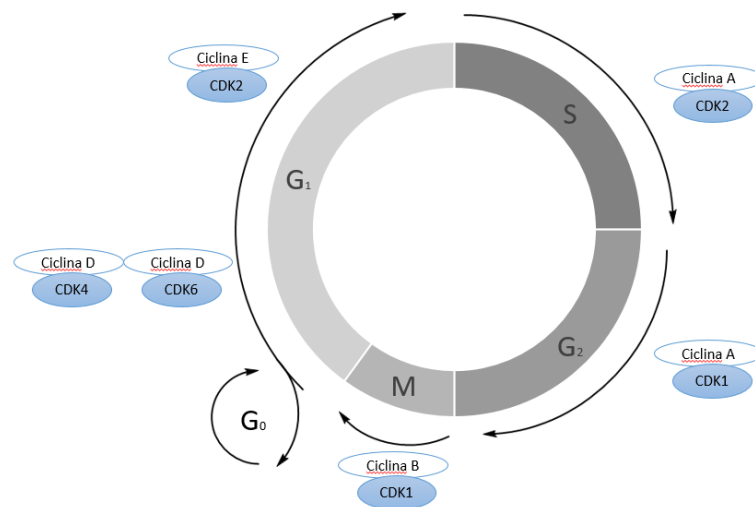
O ciclo celular é um processo extremamente organizado e regulado envolvendo várias fases sequenciais de síntese proteica e crescimento celular, replicação do DNA, mitose e citocinese, necessárias à divisão da célula (Otto & Sicinski 2017; Dickson *et al.* 2014; Vermeulen *et al.* 2003). Este processo altamente regulado envolve várias moléculas sinalizadoras do crescimento, da integridade genética de modo a evitar a transmissão de danos genéticos à descendência (Otto & Sicinski 2017).

A proliferação celular depende da progressão das quatro fases sequenciais do ciclo celular – G0/G1, S, G2 e M (Alberts *et al.* 2007; Vermeulen *et al.* 2003). No caso das células eucarióticas o ciclo celular está dividido em duas fases: interfase, que inclui as fases G1, S e G2, e a Mitose (fase M), que inclui a prófase, metáfase, anáfase e a telófase. No final da mitose ocorre a citocinese. A interfase é a fase mais longa do ciclo celular (Alberts *et al.* 2007).

Durante o período da fase S ocorre a replicação semiconservativa do DNA, ou seja, as células passam a dispor de duas cópias exatamente iguais do seu DNA. A fase S é precedida pela fase G1, na qual a célula se prepara para a síntese do DNA, e é seguido pela fase G2, na qual ocorre síntese de novas proteínas e o rápido crescimento celular, preparando a célula para a entrada na mitose (Garrett 2001; Sandal 2002). Entre a fase média e tardia de G1 existe o ponto de restrição (R), em que a célula verifica se recebeu os sinais de crescimento necessários para que possa prosseguir a divisão celular. Se os sinais de crescimento não forem suficientes a célula entrará numa fase quiescente (G0), que poderá ser temporária ou permanente, dependendo das condições extracelulares (Garrett 2001; Alberts, B. 2007).

As transições entre as várias fases do ciclo celular são reguladas por várias cinases dependentes de ciclinas (CDKs) – Figura 1.6. Este grupo de CDKs contém um core catalítico específico de serina/treonina e interagem com proteínas ciclinas que regulam o *checkpoint* do ciclo celular (Dickson

*et al.* 2014; Lim & Kaldis 2013; Satyanarayana & Kaldis 2009). A atividade cinase do complexo CDK/ciclina é regulada por inibidores de CDK (CKIs) que, sob condições desfavoráveis, impedem a progressão do ciclo celular (Lim & Kaldis 2013). O complexo CDK/Ciclina é submetido a vários tipos de regulação, quer positivos quer negativos, como por exemplo, a fosforilação proteica reversível. A fosforilação de resíduos específicos de treonina pelo ativador cinase CDK (CAK) e a desfosforilação de resíduos específicos de tirosina por fosfatases específicas de CDK, tornam o CDK ativo (Sandal 2002). Os complexos ativos de ciclina e CDK atuam sobre uma macromolécula central do sistema de controle do ciclo celular, a proteína supressora de tumores retinoblastoma (Rb) (Harbour & Dean 2000). A proteína Rb interage com a proteína E2F, que é um fator de transcrição nuclear envolvido na replicação celular durante a fase S (Sandal 2002).



**Figura 1.6 – Representação das diversas fases do ciclo celular e os complexos CDK/ciclinas ativados em cada fase.** A fase tardia G<sub>1</sub> é regulada pelos complexos CDK4/ciclina D e CDK6/ciclina D. A transição G<sub>1</sub>/S é regulada pelo complexo CDK2/ciclina E. O complexo CDK2/ciclina A regula a fase tardia da fase S e o complexo CDK1/ciclina A está envolvido na regulação da transição G<sub>2</sub>/M. Por fim, o complexo CDK1/ciclina b está envolvido na progressão da fase G<sub>2</sub> para o início da mitose.

As células que estão na fase G<sub>1</sub> ou quiescentes, o Rb encontra-se ativo na sua forma não fosforilada. Nessa forma ativa, o Rb sequestra os fatores de transcrição da família E2F, bloqueando a sua atividade sobre os promotores de diversos genes vitais para o prosseguimento de G<sub>1</sub> para a fase S (Otto & Sicinski 2017; Harbour & Dean 2000).

No início da G<sub>1</sub>, as cinases CDK4 e CDK6 são ativados pelas ciclinas do tipo D e promovem a fosforilação e a inativação da proteína supressora de tumores retinoblastoma (Rb), permitindo que o fator de transcrição E2F ative a transcrição de uma variedade de genes envolvidos na progressão do ciclo celular de G<sub>1</sub> para a fase S (Otto & Sicinski 2017; Satyanarayana & Kaldis 2009). Na progressão da fase G<sub>1</sub> para a fase S, o complexo CDK2/ciclina E tem um papel secundário na fosforilação do Rb (Sandal 2002). A cinase CDK2 é ativada quando se liga à ciclina E e completa a fosforilação do Rb levando à ativação dos fatores de transcrição E2F (Satyanarayana & Kaldis 2009). Desta forma, a ativação do complexo Cdk2/ciclina E na fase tardia de G<sub>1</sub> atua como um loop de feedback positivo na via de RB que foi iniciado pelo complexo CDK4/ciclina D e CDK6/ciclina D (Figura 1.6) (Sandal 2002; Lim & Kaldis 2013; Satyanarayana & Kaldis 2009).

Na passagem das células para a fase S, o CDK2 associa-se à ciclina A. Estas ciclinas são sintetizadas na fase S e fosforilam proteínas envolvidas na replicação do DNA. Durante a transição G<sub>2</sub>/M, a atividade

do complexo CDK1/ciclinaA é necessária para a iniciação da prófase. Por fim, o complexo CDK1/ciclina b fosforila proteínas necessárias para a progressão de G2 para a mitose (Cheffer *et al.* 2013; Satyanarayana & Kaldis 2009; Garrett 2001).

## 1.2. Terapia do cancro

Os procedimentos terapêuticos para pacientes com cancro dependem de uma variedade de fatores, tais como, a patologia específica, as características moleculares do cancro, a sua localização, a progressão da doença e o estado de saúde do paciente (Luqmani 2005). O objetivo final da terapia é eliminar todas as células cancerígenas com os mínimos efeitos no tecido saudável/normal. Desta forma, é necessário privar as células cancerígenas de sinais necessários para a proliferação celular (Luqmani 2005). Existe diversos tipos de tratamento que podem ser aplicados individualmente ou combinados (Luqmani 2005).

Atualmente, as estratégias mais utilizadas para a terapia do cancro são baseadas na cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Silva, Fernandes, *et al.* 2014; Luqmani 2005). A cirurgia é a primeira linha da terapia mais frequente no tratamento do cancro, podendo ter uma função curativa nomeadamente nos estádios precoces do cancro. A radioterapia é frequentemente usada em tumores sólidos localizados, seja como terapia adjuvante após a cirurgia, de forma a prevenir uma nova ocorrência, ou antes da cirurgia para reduzir o volume do tumor (Luqmani 2005; Watanabe *et al.* 2012). A quimioterapia consiste no uso de agentes que promovem a morte de células cancerígenas num determinado tipo de cancro e tem como objetivo eliminar as células/tecidos cancerígenos (Longley & Johnston 2005).

Em pacientes com cancro confinado no ovário a cirurgia é suficiente para a remoção do tumor em mais de 90% de pacientes. No entanto, o tumor pode metastizar para outros órgãos antes de ser diagnosticado e, nestes casos, o tratamento baseia-se na cirurgia citoreductora e na quimioterapia à base de platinos e taxanos (Agarwal & Kaye 2003; Stewart & Kleihues 2014).

Atualmente, a quimioterapia é realizada com seis ciclos de agentes quimioterapêuticos à base de platinos e taxanos, como por exemplo, a combinação de ciclofosfamida com a doxorrubicina e cisplatina, ou com o paclitaxel. A carboplatina também é utilizada e mostrou ter uma eficácia comparada com a cisplatina e uma menor citotoxicidade (Jayson *et al.* 2014). A combinação do paclitaxel com a cisplatina tem sido utilizada como primeira linha no tratamento do cancro do ovário (Agarwal & Kaye 2003; Coward *et al.* 2015).

Os agentes de platina (cisplatina e carboplatina) interagem com o DNA, RNA e proteínas, sendo que o mecanismo citotóxico advém da formação de ligações cruzadas intercadeias e intracadeia com o DNA, que são reconhecidos por várias proteínas que poderão reparar danos no DNA ou induzir a apoptose. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) atuam através da ligação à  $\beta$ -tubulina intracelular e promovem a estabilização dos microtúbulos, afectando a progressão do ciclo celular e induzindo a apoptose (Chien *et al.* 2013; Colombo *et al.* 2010).

Apesar dos vários avanços na compreensão da patologia do cancro do ovário, a taxa de sobrevivência continua a ser baixa quando comparada com os cancros da mama e da próstata. Um dos fatores que contribui para a baixa taxa de sobrevivência é o desenvolvimento da resistência à quimioterapia após vários ciclos de quimioterapia (Chien *et al.* 2013). Na última década, novas classes de agentes quimioterapêuticos têm sido desenvolvidos com o propósito de superar a resistência associada à quimioterapia, através de terapias direcionadas para uma específica patologia (Yap *et al.* 2009).

### 1.2.1. Quimioterapia

A quimioterapia é uma das principais terapias em oncologia e é utilizada como terapia primária e terapia adjuvante (Mellor & Callaghan 2008). Idealmente, os agentes quimioterapêuticos devem apresentar especificidade somente para as células tumorais, através da indução dos efeitos citotóxicos ou citostáticos com o mínimo de efeito nas células saudáveis (Johnstone *et al.* 2002). No entanto, existem vários fatores que afetam a eficácia da quimioterapia, incluindo toxicidade sistêmica devido à falta de especificidade, metabolismo rápido dos fármacos e a capacidade das células tumorais adquirirem resistência a agentes citotóxicos e citostáticos (Gordon & Nelson 2012; Johnstone *et al.* 2002).

Os agentes quimioterapêuticos podem induzir uma série de respostas celulares com o objetivo de provocar alterações nos processos celulares essenciais, através da indução de várias lesões (Savage *et al.* 2009). No entanto, estes processos também iram atuar nas células normais, o que resulta em efeitos secundários indesejados por parte destes agentes. A desregulação dos eventos do ciclo celular, devido a mutações nas células cancerosas, diferencia-as das normais e oferece uma oportunidade de desenvolvimento de agentes que possam afetar as células tumorais sem consequência para as células saudáveis (Luqmani 2005).

**Tabela 1.1: Principais grupos de agentes quimioterapêuticos, discriminando os principais agentes e o seu mecanismo de ação.**

| <b>Grupos quimioterapêuticos</b> | <b>Agentes quimioterapêuticos</b>            | <b>Mecanismo de ação</b>  |
|----------------------------------|--|---|
| Agentes alquilantes              | Cisplatina<br>Cisplatinamida<br>Temozolomida | Cross-link das cadeias do DNA                                   |
| Antimetabolitos                  | 5-fluorouracil<br>Metotrexato                | Inibição de enzimas<br>Introdução de substâncias falsas no DNA  |
| Antibióticos citotóxicos         | Doxorrubicina<br>Idarubicina                 | Intercalação<br>Inibição da topoisomerase II<br>Formação de ROS |
| Inibidores mitóticos             | Paclitaxel                                   | Inibição da polimerização dos monómeros da tubulina             |
| Inibidores de topoisomerasas     | Camptotecina<br>Irinotecano<br>Etoposídeo    | Inibição da topoisomerase I e II                                |

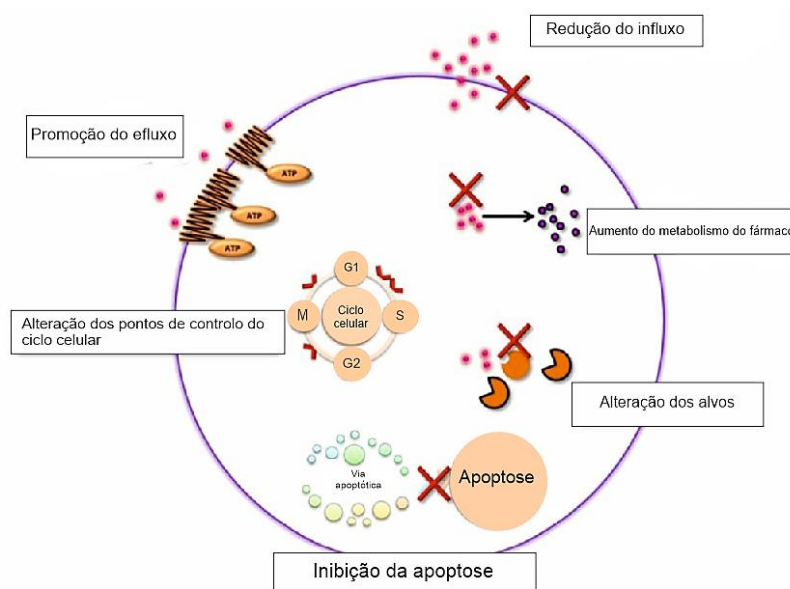
Os agentes quimioterapêuticos citotóxicos têm como alvo células que proliferam ativamente e estão incluídos numa diversidade de grupos, tais como, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, inibidores mitóticos e inibidores de topoisomerasas (Calderón-montaña *et al.* 2014; Mihlon *et al.* 2010). Os agentes alquilantes modificam as bases do DNA, interferindo com a replicação e transcrição. As ligações covalentes de hidrocarbonetos com o DNA promovem o seu *cross-link*, que resulta num mecanismo de morte celular programada ou na necrose da célula (Luqmani 2005; Mihlon *et al.* 2010), como é o caso da cisplatina, cisplatinamida e temozolomida (Luqmani 2005). Os agentes antimetabolitos competem com moléculas fisiológicas na formação de macromoléculas celulares, afetando a síntese do DNA e RNA. Isso geralmente acontece com a substituição de um nucleótido (ex., 6-mercaptopurina) ou prevenindo a síntese de um nucleótido (ex. 5-fluorouracil) (Mihlon *et al.* 2010). Os antibióticos citotóxicos são um grupo de agentes antitumorais que podem ser mediados por três diferentes mecanismos (Calderón-montaña *et al.* 2014). Alguns podem intercalar entre os pares de base da cadeia de DNA/RNA, como é o caso da doxorrubicina, alterar a atividade da topoisomerase II, levando à formação de danos no DNA mediada pela topoisomerase II e podem gerar a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Calderón-montaña *et al.* 2014; Luqmani 2005; Zhang *et al.* 2015).



Os inibidores mitóticos afetam a formação das fibras dos microtúbulos necessárias para o alinhamento cromossômico. Estes agentes impedem a polimerização dos monômeros da tubulina provocando paragens no ciclo celular. Os agentes mais utilizados são derivados de plantas alcaloides, tais como, paclitaxel (Calderón-montaña *et al.* 2014; Mihlon *et al.* 2010). Os inibidores de topoisomerase são responsáveis pela promoção de quebras transientes do DNA mediada por enzimas de DNA topoisomerase I e II, criando quebras na cadeia dupla do DNA, afetando a sua replicação (Calderón-montaña *et al.* 2014).

A principal desvantagem da quimioterapia reside no desenvolvimento de resistência das células tumorais à terapêutica de alguns tipos de agentes quimioterapêuticos (Ullah 2008). As células tumorais podem adquirir resistência devido a características genéticas ou podem desenvolver resistência após a exposição contínua do fármaco (Luqmani 2005). Portanto, pacientes que inicialmente respondiam ao tratamento podem mostrar uma perda de resposta, resultando no crescimento do tumor (Luqmani 2005). Essa resistência pode observar-se para um fármaco já utilizado ou pode ser mais generalizada.

A resistência a múltiplos fármacos (MDR, *multidrug resistance*) é definida como, a resistência ou a insensibilidade de as células cancerígenas aos efeitos citotóxicos e citostáticos provocados por vários agentes anticancerígenos, que têm diferentes alvos moleculares (Ullah 2008). Muitos mecanismos foram propostos de forma a explicar a quimioresistência, incluindo a diminuição da acumulação do agente no tumor, o aumento da desintoxicação celular, o aumento da atividade do reparo do DNA, a diminuição da indução da apoptose e a potencialização da paragem do ciclo celular como resposta a danos celulares (Figura 1.7) (Luqmani 2005; Kigawa 2013).



**Figura 1.7 – Mecanismos gerais de resistência a agentes quimioterapêuticos.** Células cancerosas conseguem desenvolver resistência a múltiplos fármacos por vários mecanismos, tais como: diminuição do influxo do fármaco, diminuição da concentração intracelular do agente através da promoção do efluxo, alterações na progressão do ciclo celular, alteração dos alvos, aumento do metabolismo do fármaco e indução de genes que inibem a via apoptótica (Adaptada de Chai *et al.* 2010).

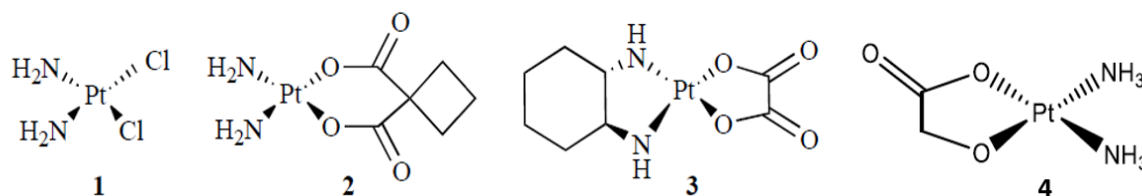
Apesar da resistência a agentes quimioterapêuticos ser um dos maiores obstáculos no tratamento do câncer, a quimioterapia também apresenta como desvantagens os efeitos secundários sobre células saudáveis. Portanto, o desenvolvimento de novos compostos antitumorais que inibam as células tumorais especificamente e seletivamente é atualmente um dos objetivos principais no desenvolvimento de novos fármacos com eficácia no tratamento do câncer.

### 1.2.2. Metalofármacos para quimioterapia do cancro

Desde a descoberta das propriedades antiproliferativas da cisplatina, *cis*-[Pt(II)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], estes complexos de coordenação têm sido extensamente usados na terapia do cancro (Han *et al.* 2011; Martins *et al.* 2014).

Trinta anos após a sua aprovação como agente quimioterapêutico pela FDA (*North American Food and Drug Administration*) a cisplatina continua a ser um dos agentes anticancerígenos mais vendidos, sendo responsável pela cura de mais de 90% dos câncros testiculares e desempenhando um papel importante em alguns tratamentos contra o cancro do ovário, cancro da cabeça e pescoço, cancro da bexiga, cancro cervical, melanomas e linfomas (Pizarro & Sadler 2009). A cisplatina produz danos no DNA semelhantes aos de agentes alquilantes, atuando através de uma reação de hidrólise no qual dois átomos de cloro são substituídos por moléculas de água ou por grupos hidroxilos (Alama *et al.* 2009). A atividade antitumoral da cisplatina é atribuída à formação de aductos com a molécula de DNA que inibem a replicação e a transcrição do DNA, afetando o crescimento do tumor. Os aductos formados pela cisplatina com o DNA resultam em aductos bifuncionais entre duas bases adjacentes na mesma cadeia, destacando-se os aductos 1,2 GG intracadeia em 50 a 65 % dos casos, os aductos 1,2 AG intracadeia em 25 % dos casos e ainda os aductos 1,3 GNG intracadeia em menos de 10% dos casos (Pizarro & Sadler 2009; Zhang & Å 2003). Devido à afinidade da platina para os doadores de enxofre e selênio presentes em muitas proteínas do plasma, a cisplatina pode interagir e interromper as funções das diferentes proteínas e enzimas (Medici *et al.* 2014).

Apesar das vantagens da cisplatina, esta apresenta uma reduzida seletividade para células tumorais, o que leva a uma elevada toxicidade em tecidos saudáveis. Resultando em efeitos secundários muito debilitantes para o paciente que incluem fraqueza, náusea, vômitos, neuropatia e toxicidade nos rins (Pizarro & Sadler 2009). Além disso, a sua eficácia é frequentemente perdida após vários ciclos de quimioterapia, porque as células tumorais tornam-se resistentes ao tratamento (Côrte-Real *et al.* 2013; Bergamo *et al.* 2012; Morais *et al.* 2016). As atuais limitações da cisplatina desencadearam o desenvolvimento de um grande número de compostos análogos à cisplatina, com propriedades farmacológicas melhoradas e uma gama mais ampla de atividade antitumoral (Motswainyana & Ajibade 2015; Brabec & Nováková 2006). Até à data, a cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina são os únicos metalofármacos aprovados para uso clínico em todo o mundo, enquanto que a nedaplatina apresenta uma utilização clínica restrita ao Japão (Figura 1.8) (Hannon 2007). No entanto, estes novos complexos não demonstraram uma vantagem significativa em relação à cisplatina (Zhang & Å 2003). Por isso, é necessário desenvolver novos agentes antitumorais que consigam superar a toxicidade associada aos compostos de platina de modo a melhorar a eficácia clínica (Ma *et al.* 2016).



**Figura 1.8 – Formula estrutural dos metalofármacos de platina(II) atualmente em uso clínico em quimioterapia:** Cisplatina (1), Carboplatina (2), Oxaliplatina (3), Nedaplatina (4) (Adaptado de Abid *et al.* 2016).

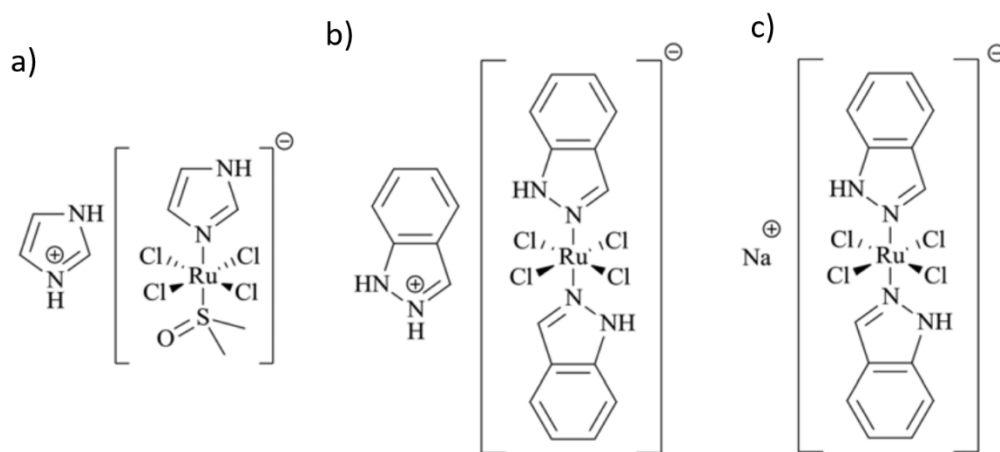
O sucesso do tratamento clínico desencadeou o interesse por compostos de platina e por outros complexos contendo iões metálicos para o uso de agentes anticancerígenos. Neste contexto, os

complexos de rutênio têm conquistado um lugar de relevo pelos seus excelentes resultados como potenciais agentes anticancerígenos.

### 1.2.3. Compostos de rutênio como potenciais metalofármacos para o cancro

Os complexos de rutênio são já reconhecidos como uma alternativa eficaz aos complexos de platina, proporcionando diferentes mecanismos de ação, um espectro de atividade diferente, e potencial para superar a resistência que está associada à platina (Demoro *et al.* 2013; Tomaz *et al.* 2012). O rutênio apresenta inúmeras propriedades: i) capacidade de assumir diversos estados de oxidação acessíveis biologicamente ( $Ru^{II}$ ,  $Ru^{III}$ ,  $Ru^{IV}$ ); ii) têm a capacidade de coordenar ligandos que podem modular a sua atividade; iii) têm a possibilidade de ocupar um elevado numero de posições espaciais devido à sua geometria de coordenação octaédrica; iv) uma reduzida toxicidade quando comparada com compostos de platina, que é atribuída à sua capacidade de mimetizar a ligação do ferro à transferrina sérica (Bergamo *et al.* 2012; Motswainyana & Ajibade 2015).

Dos numerosos complexos de rutênio estudados muitos demonstraram um potencial efeito antitumoral e atualmente três complexos de  $Ru(III)$  entraram em ensaio clínicos: *trans*- $[RuCl_4(DMSO)(Im)]$   $[ImH]$  (NAMI-A, Im = imidazole), *trans*- $[Ru(In)_2Cl_4]$   $[InH]$  (KP1019, In = indazole), e NKP-1339 (sal de sódio de KP1019) (Figura 1.9) (Zhang & Sadler 2017; Motswainyana & Ajibade 2015). Apesar destes três compostos inorgânicos apresentarem estruturas químicas semelhantes exibem um comportamento biológico completamente diferente. O NAMI-A é um composto anti-metástático que pode reduzir o peso das metástases e prevenir a propagação de tumores secundários (Gransbury *et al.* 2016; Clavel *et al.* 2015), enquanto que o KP1019 é um composto citotóxico eficaz contra tumores primários (Bergamo *et al.* 2009). O NAMI-A e o KP1019 completaram com sucesso a fase I dos ensaio clínicos, no entanto, o NAMI-A foi recentemente retirado do ensaio clínico, após a fase II, devido à pouca eficácia demonstrada (Zhang & Sadler 2017; Leijen *et al.* 2015). O NKP-1339 tem mostrado resultados promissores em tumores sólidos, como carcinoma colorectal e em tumores neuroendócrinos (Flocke *et al.* 2016).



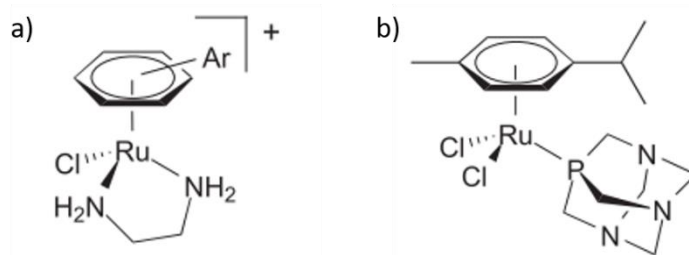
**Figura 1.9 – Estruturas químicas dos agentes antitumorais em ensaios clínicos.** a) NAMI-A, b) KP1019, c) NKP-1339 (Adaptado de Kuhn *et al.* 2015).

O estudo do modo de ação do KP1019 conduziu à hipótese de que a atividade dos complexos de  $Ru(III)$  é dependente da redução *in vivo* do centro metálico para espécies mais reativas de  $Ru(II)$ . Este estudo levou ao aumento de interesse no potencial anticancerígeno dos compostos de  $Ru(II)$  (Rijt & Sadler 2009).

Os complexos de Ru(II) têm uma grande tendência para oxidar, necessitando de algo que os estabilize nesse estado de oxidação. O Ru(II) pode ser estabilizado através do co-ligando areno, nos complexos organometálicos em banco de piano {Ru-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>}, por ciclopentadienilo nos {Ru-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>}, ou em complexos octaédricos, de dois ligandos do tipo polipiridina, como {Ru(bpy)<sub>2</sub>} ou {Ru(phen)<sub>2</sub>}. O centro que estabiliza o Ru(II) apresenta 3 posições de coordenação – no caso dos complexos em banco de piano – ou 2 posições de coordenação – no caso dos complexos com ligandos polipiridínicos.

#### 1.2.3.1. Complexos organometálicos de Ruténio(II) - areno

Os compostos organometálicos (complexos que contêm, pelo menos, uma ligação covalente metal-carbono) oferecem a possibilidade de desenhar moléculas apropriadas para a ligação a alvos biológicos específicos (Alama *et al.* 2009; Martins *et al.* 2014; Han *et al.* 2011), devido ao facto de exibirem uma ampla gama de números de coordenação e geometrias possíveis que permite a organização espacial dos diferentes aniões e ligandos orgânicos (Rijt & Sadler 2009; Alama *et al.* 2009). Os complexos de ruténio(II) organometálicos com ligando areno (Ru(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)) representam um grupo de compostos de ruténio com atividade antitumoral (Brabec & Nováková 2006; Morais *et al.* 2016). Estes complexos apresentam uma geometria em “banco de piano” com potencial para ultrapassar as desvantagens dos fármacos tradicionais como a cisplatina, em relação à sua resistência, seletividade e toxicidade (Kostova 2006). Foram desenvolvidas, principalmente, duas famílias de complexos organometálicos: os complexos de ruténio(II)(η<sup>6</sup>-areno), como é o caso do [Ru(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)(en)]Cl (en=etilenodiamina) (Figura 1.10); e os complexos RAPTA, ruténio (II)-areno com o ligando monodentado PTA (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfoadamanteno)(Han & Dyson 2006; Sadler *et al.* 2006).



**Figura 1.10 – Fórmula estrutural dos complexos com o fragmento “Ru(η<sup>6</sup>-areno)”.** a) RAPTA-C = [Ru(η<sup>6</sup>-p-cimeno)(PTA)Cl<sub>2</sub>], b) [Ru(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)(en)]Cl (Adaptado de Nazarov *et al.* 2014).

Vários complexos organometálicos Ru(II)(areno) demonstraram ser ativos *in vitro* e *in vivo* na linha celular do carcinoma humano do ovário (A2780), com valores de IC<sub>50</sub> comparáveis aos da cisplatina. Os ligandos quelantes bidentados estáveis (etilenodiamina), o ligando de areno mais hidrofóbico (tetrahidroantraceno) e o ligando cloreto foram associados a complexos com uma atividade aumentada (Kostova 2006).

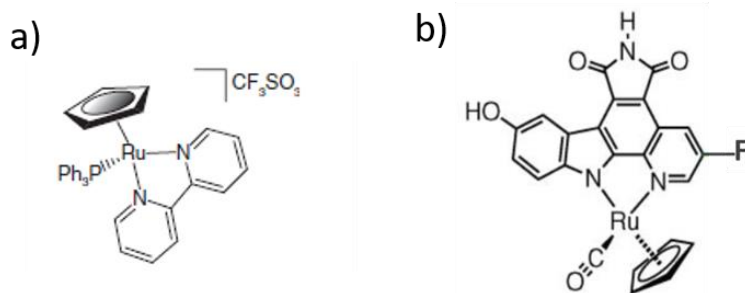
A família RAPTA compreende um ligando monodentado PTA e o ligando η<sup>6</sup>-areno. Estes complexos são geralmente estáveis ao ar e têm uma boa estabilidade termodinâmica (Han *et al.* 2011). O RAPTA-C, [(η<sup>6</sup>-p-cimeno)Ru(PTA)Cl<sub>2</sub>] (Figura 1.10), tem tido um papel central na avaliação biológica, sendo o composto de referência no desenvolvimento de outros complexos da família RAPTA (Han & Dyson 2006). Este complexo demonstrou uma baixa citotoxicidade *in vivo*, mas relevantes propriedades anti-metastáticas e anti-angiogénicas *in vivo* (Levina *et al.* 2009; Clavel *et al.* 2015). Mais recentemente, foi demonstrado que o complexo RAPTA-C reduz o crescimento de tumores primários em modelos pré-clínicos nos carcinomas do ovário e colorectal, através de um mecanismo anti-angiogénico (Weiss *et al.* 2014).

Os complexos RAPTA interagem com alvos moleculares diferentes do DNA; implicando um modo de ação diferente do agente anticancerígeno Pt (Han *et al.* 2011; Casini *et al.* 2008).

### 1.2.3.2. Complexos organometálicos de rutênio(II) - ciclopentadienilo

Durante os últimos anos, o grupo de Química Organometálica do Centro Química Estrutural da Faculdade de Ciências (ULisboa), tem desenvolvido novos agentes com potencial efeito antiproliferativo. Uma nova família de complexos de rutênio de formula geral  $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PP})\text{L}]^+$ , em que Cp corresponde ao ligando ciclopentadienilo ( $\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$ ), L é um ligando heterocíclico azotado (mono ou bidentado) e o PP um ligando monodentado ou bidentado de fosfano (Tomaz *et al.* 2012; Morais *et al.* 2016).

Dos vários complexos desenvolvidos pelo grupo, destaca-se como potencial agente anticancerígeno, o TM34 ( $[\text{RuCp}(\text{bpy})(\text{PPh}_3)] [\text{CF}_3\text{SO}_3]$  (Cp = ciclopentadienilo, bpy=2,2'-bipiridina,  $\text{PPh}_3$ =trifenilfosfano) (Figura 1.11), que mostrou ser citotóxico contra as linha celulares A2780 (adenocarcinoma do ovário), PC3 (carcinoma da próstata humana), MCF7 e MDAMB231 (Carcinoma da mama) e HT29 (carcinoma do cólon) (Tomaz *et al.* 2012; Côrte-Real *et al.* 2015). Observou-se que o complexo TM34 se acumula seletivamente na membrana celular e no citosol em células tumorais A2780 e na MDA-MB-231 (Côrte-Real *et al.* 2013).



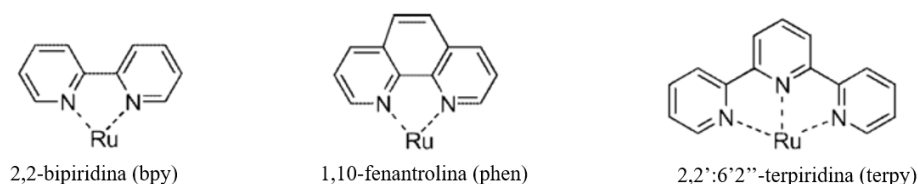
**Figura 1.11 – Formula estrutural do a) TM34,  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{bpy})(\text{PPh}_3)] [\text{CF}_3\text{SO}_3]$ , b) NP309** (Meggers *et al.* 2009; Morais *et al.* 2016)

Assim, considerando os resultados promissores obtidos pelo composto TM34, outro composto desta família também foi avaliado de forma a investigar se as alterações no ligando bipiridina influenciariam a atividade biológica obtidas. Observando-se que o complexo homólogo  $[\text{RuCp}(\text{Me}_2\text{bpy})(\text{PPh}_3)[\text{CF}_3\text{SO}_3]$  ( $\text{Me}_2\text{bpy}$  = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina), apresentava uma elevada atividade contra a linha celular MCF7 (Morais *et al.* 2013).

Meggers e colaboradores desenvolveram alguns complexos de Ru(Cp), tais com o NP309 (Figura 1.11), um complexo organometálico de rutênio que mimetiza a forma da estaurosporina. Este complexo que mostrou induzir apoptose através da via mitocondrial em células do Linfoma de Burkitt (Meggers *et al.* 2009).

### 1.2.3.3. Complexos de rutênio(II) com ligandos polipiridínicos

Os complexos de rutênio com ligandos polipiridínicos como a bpy, 1,10- fenantrolina (phen) e 2,2':6'2''-terpiridina (terpy) têm sido extensamente investigados (Figura 1.12). Este tipo de ligandos estabiliza o íon metálico rutênio no estado de oxidação(II), originando complexos estáveis em solução aquosa.



**Figura 1.12 – Ligandos polipiridínicos utilizados em complexos de rutênio(II).** (Adaptado de Han & Dyson 2006).

Os ligandos polipiridínicos podem conferir propriedades fotoluminescentes aos complexos Ru(II), através de uma transferência de carga entre o metal e o ligando (Medici *et al.* 2014). Vários compostos de rutênio têm sido investigados para o potencial uso no tratamento do cancro. Muitos deles são desenvolvidos de forma a interagirem especificamente com o alvo DNA, mas apenas alguns foram submetidos a estudos biológicos detalhados. Estes complexos parecem atuar por intercalação nas células tumorais, embora em alguns casos tenha sido demonstrado que eles podem operar por fotoclivagem do DNA, ou também podem induzir morte celular pela via mitocondrial (Liu *et al.* 2011; Wachter *et al.* 2012; Qian *et al.* 2013).



**Figura 1.13 – Fórmula estrutura dos complexos do tipo [Ru(bpy)<sub>2</sub>HL]<sup>2+</sup> sintetizados por Beckgor e colaboradores**(Adaptado de F. A. Beckford *et al.* 2011; Beckford *et al.* 2009).

A atividade e propriedades destes tipos de complexos são modelados pelo co-ligando bidentado que completa a esfera de coordenação do Ru(II).

#### 1.2.3.4. Complexos de rutênio com co-ligandos tiossemicarbazona

As tiossemicarbazonas (TSC) são compostos de considerável interesse terapêutico devido à sua atividade biológica, nomeadamente, antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, entre outras (Hussein *et al.* 2015; F. Beckford *et al.* 2011). Devido ao seu perfil farmacológico têm sido extensivamente estudadas em química medicinal (Demoro *et al.* 2013; Bisceglie *et al.* 2016).

A sua atividade antitumoral é extremamente diferenciada e é muito dependente da tipologia das células tumorais. Esta característica torna esta classe de compostos muito interessante devido à sua seletividade intrínseca. Atualmente os principais efeitos conhecidos deste tipo de composto são a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (RR), a produção de espécies de oxigénio, a inibição da topoisomerase II, a disrupção da membrana mitocondrial e a inibição da MDR1 (Pelosi 2010). As propriedades biológicas dos ligandos da família das tiossemicarbazonas podem ser modificadas e melhoradas com a coordenação a iões metálicos, como é o caso do complexo de rutênio (F. Beckford *et al.* 2011; Demoro *et al.* 2013).

Os ligandos da família das tiossemicarbazonas são interessantes como possíveis co-ligandos da estrutura de Ru(II)(bipiridina), formando complexos com atividade biológica promissora. No entanto, esta família de complexos ([Ru(bpy)<sub>2</sub>(TSC)] está ainda pouco explorada, com escassos exemplos na literatura.

Beckford e os seus colaboradores sintetizaram dois complexos de Ru(II), usando como ligandos a 2,2'-bipiridina e tiossemicarbazonas (Figura 1.13) (F. A. Beckford *et al.* 2011; Beckford *et al.* 2009). Estes complexos apresentaram boa atividade citotóxica nas linhas celulares MCF7 (carcinoma da mama), MDAMB231 (adenocarcinoma da mama), HCT116 (carcinoma colorretal) e HT29 (adenocarcinoma colorretal) (Beckford *et al.* 2009; F. A. Beckford *et al.* 2011).

Todos estes resultados sugerem que o desenvolvimento de compostos de ruténio como agentes quimioterapêuticos é muito promissor e pode contribuir na terapia do cancro.

O foco do presente trabalho foi o estudo de quatro novos complexos, sendo o ligando bpy bem conhecido como um excelente agente quelante, eficiente e estabilizador de Ru(II) e o co-ligando orgânico do tipo aril-tiossemicarbazona (HL), que apesar de terem atividade conhecida, há pouca informação sobre a atividade, seletividade e modo de ação.

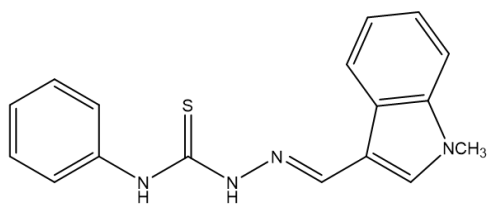
## 2. Objetivo

Os complexos de ruténio são atualmente um objeto de investigação intensa e são reconhecidos como uma alternativa promissora numa terapêutica viável (Bergamo & Sava 2011). No Laboratório de Química Organometálica (DQB, CQE-FCUL) sintetizaram-se e caracterizaram-se recentemente novos complexos de Ru(II) para os quais estudos preliminares indicaram uma boa atividade antiproliferativa, nomeadamente complexos com bipyridinas e co-ligandos do tipo aril tiossemicarbazonas, formulados como  $[Ru(bpy)_2(TSC)] [X]_2$ , (em que bpy = 2,2-bipiridina, TSC = ligando tiossemicarbazona, e X o contra-íão triflato,  $CF_3SO_3^-$ ) (Esquema 1) sendo promissores para aplicação terapêutica (Poeta 2015; Assis 2015). De forma a reconhecer como verdadeiros candidatos terapêuticos, é fundamental investigar o mecanismo de ação pelo qual estes complexos exercem a sua atividade, assim como a identificação de novos alvos interessantes.

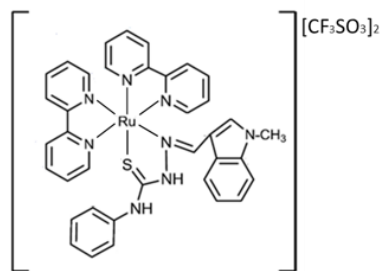
Tendo em conta tudo isto, este trabalho teve como objetivos:

- i) Caracterizar o potencial antiproliferativo dos complexos e ligandos em linhas tumorais humanas e em linhas não tumorais humanas;
- ii) Compreender o mecanismo de ação dos complexos que demonstraram uma maior seletividade para uma determinada linha tumoral, focando:
  - a. os mecanismos subjacentes à morte celular induzida por estes complexos (apoptose, necrose ou autofagia);
  - b. a potencial alteração na progressão do ciclo celular;
  - c. o efeito dos complexos no potencial da membrana mitocondrial;
  - d. a indução de espécies reativas de oxigénio;
  - e. a distribuição preferencial dos complexos ao nível celular;
  - f. a genotoxicidade do complexo, através da sua capacidade de interferir com a molécula do DNA;
  - g. os seus potenciais alvos celulares através da análise do proteoma de linhas tumorais;
  - h. a interação dos complexos com as albuminas do soro (BSA e HSA).

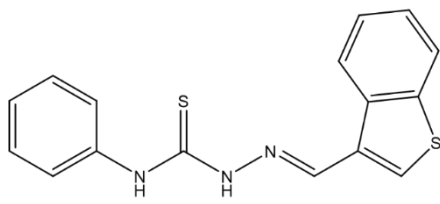




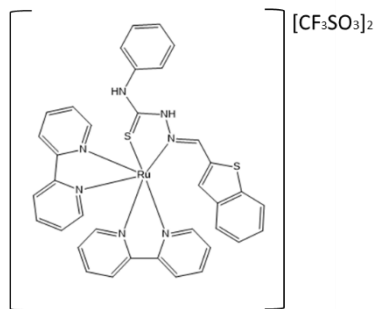
Ligando (*E*)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida – HL1



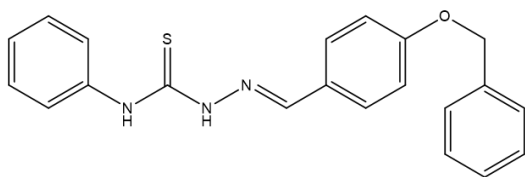
Complexo  $[Ru(bpy)_2(HL1)][CF_3SO_3]_2$  (ACP19)



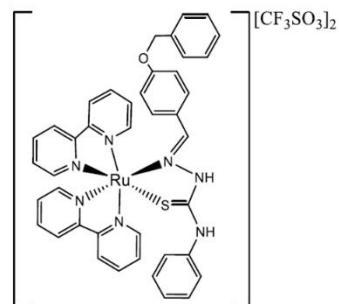
Ligando (*E*)-2-benzotiofeno-N-fenil-hidrazinacarbotoamida – HL2



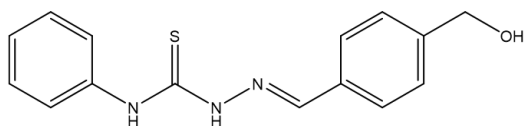
Complexo  $[Ru(bpy)_2(HL2)][CF_3SO_3]_2$  (SA25)



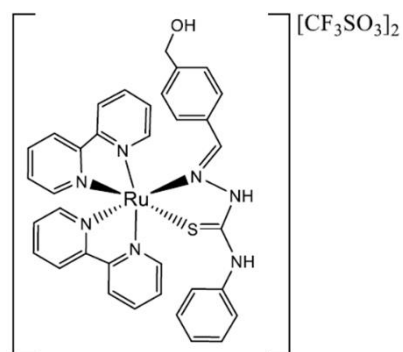
Ligando (*E*)-2-(4-(benziloxi)benzilideno)-N-fenil-hidrazina-1-carbotoamida – HL3



Complexo  $[Ru(bpy)_2(HL3)][CF_3SO_3]_2$  (SA22)



Ligando (*E*)-2-(4-(hidroximetil)benzilideno)-N-fenil-hidrazina-1-carbotoamida – HL4



Complexo  $[Ru(bpy)_2(HL4)][CF_3SO_3]_2$  (SA23)

Esquema 1: Fórmula estrutural dos ligandos da classe das tiossemicarbazonas e dos complexos correspondentes de  $[Ru(bpy)_2]$  estudados.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Complexos em estudo

Os compostos de ruténio utilizados nesta tese foram sintetizados e caracterizados no Centro de Química Estrutural da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Os compostos são constituídos pelo íão metálico Ru(II) e pelos ligandos bpy e por ligandos orgânicos do tipo aril tiossemicarbazonas, sendo diferentes na parte arilica ligada a N.

As fórmulas químicas, os pesos moleculares de cada um dos complexos e os solventes utilizados na preparação das soluções *stock*, encontram-se descritos na Tabela 3.1. As amostras na forma sólida foram armazenadas à temperatura ambiente e na forma líquida foram congeladas.

**Tabela 3.1 – Propriedades dos compostos utilizados no presente trabalho**

|                    |       | Formulação   | Peso molecular (g/mol) | Solvente |
|--------------------|-------|--|------------------------|----------|
| <b>Complexo</b>    | ACP19 | $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{TSC-IndNCH}_3) [\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$<br>$\text{C}_{39}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_6\text{RuS}_3$        | 1075,2                 | DMSO     |
|                    | SA25  | $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{TSC-Bztio})] [\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$<br>$\text{C}_{38}\text{H}_{29}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_6\text{RuS}_4$         | 1065,5                 | DMSO     |
|                    | SA22  | $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{TSC-OCH}_2) [\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$<br>$\text{C}_{48}\text{H}_{50}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_7\text{RuS}_3$           | 1111,3                 | Etanol   |
|                    | SA23  | $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{TSC-CH}_2\text{OH})] [\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$<br>$\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_7\text{RuS}_3$ | 1047,9                 | Etanol   |
| <b>Ligando TSC</b> | HL1   | TSC-IndNCH <sub>3</sub><br>$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$  | 308,4                  | DMSO     |
|                    | HL2   | TSC-Bztio<br>$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}_2$  | 311,4                  | DMSO     |
|                    | HL3   | TSC-OCH <sub>2</sub><br>$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{OS}$  | 361,46                 | Etanol   |
|                    | HL4   | TSC-CH <sub>2</sub> OH<br>$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{OS}$  | 285,39                 | Etanol   |

Os complexos  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{TSC})]$  e respetivos ligandos TSC foram sintetizados e caracterizados como descrito anteriormente (Assis 2015; Poeta 2015). Como estes complexos e ligandos não são solúveis em água foi necessário usar um co-solvente orgânico adequado a estudos biológicos. O DMSO é o solvente mais comum utilizado devido à boa capacidade de solvatação, relativa inércia química, à alta temperatura de ebulição e ponto de congelamento. (Cheng *et al.* 2003).

Os complexos ACP19 e SA25, e os respetivos ligandos são estáveis em DMSO (Sigma, St. Louis, EUA) o que levou à progressão dos estudos com este co-solvente. No entanto, os complexos SA22 e SA23 e os respetivos ligandos demonstraram alterações na sua estrutura, indicando que não eram estáveis em DMSO. Outros dois solventes utilizados frequentemente como veículo de administração são o etanol e o metanol. Usou-se o etanol (Sigma, St. Louis, EUA) como co-solvente destes dois complexos. No caso do SA22 o perfil espectral é alterado significativamente num curto espaço de tempo, o que significa que, apesar de ser solúvel em etanol o complexo não é estável neste solvente. Em relação ao SA23 o complexo mostrou ser estável em solução de etanol (Assis 2015; Poeta 2015).

Portanto, no caso dos complexos ACP19, SA25 e SA23 e os respectivos ligandos prepararam-se soluções stock de diferentes concentrações, nomeadamente de 50 mM para o ACP19, HL1 e para o SA25 e HL2 e de 10 mM para o SA23 e HL4, que foram alíquotadas e armazenadas a -20°C até à sua utilização devido à sua estabilidade em solução. O SA22 e o HL3 foram solubilizados a uma concentração de 10 mM aquando da realização de um ensaio biológico. Os complexos e ligandos foram diluídos em meio de cultura fresco a partir da solução stock, até à concentração desejada para cada ensaio.

### 3.2. Linhas celulares humanas

#### 3.2.1. Cultura das Linhas tumorais e não-tumorais

Durante o desenvolvimento deste projeto quatro linhas celulares tumorais humanas, A2780 (linha celular do carcinoma do ovário), HCT116 (linha celular do carcinoma colorectal), A549 (linha celular do carcinoma do pulmão) e MCF-7 (linha celular do carcinoma da mama), foram utilizadas de forma a caracterizar o potencial antiproliferativo dos compostos em estudo. Com o intuito de avaliar a efeito citotóxico dos complexos em estudo em células não-tumorais, recorreu-se à utilização da cultura primária de fibroblastos. Todas as linhas celulares foram obtidas pelo ATCC (American Type Culture Collection). Na Tabela 3.2 estão resumidas as linhas celulares usadas, assim como as suas características.

**Tabela 3.2 – Linhas celulares utilizadas e as suas características (fonte, morfologia celular e meio de cultura).** DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); RPMI - *Roswell Park Memorial Institute medium* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); FBS – Soro Fetal Bovino (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); antibiótico Penicilina-Estreptomicina + Antimicótico (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); *MEM non-essential amino acid 100x* (Sigma, St. Louis Missouri, EUA). (Fonte: ATCC – The Global Bioresource Center, 2015)

| LINHA CELULAR       | FONTE                | MORFOLOGIA                    | MEIO DE CULTURA % (V/V)             |
|---------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| <b>HCT116</b>       | Carcinoma colorectal | Epitelial                     | DMEM; FBS 10%; Pen/Strep 1%; MEM 1x |
| <b>A2780</b>        | Carcinoma do ovário  | Epitelial                     | RPMI, FBS 10%, Pen/Strep 1%, MEM 1x |
| <b>MCF-7</b>        | Carcinoma da mama    | Epitelial                     | DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%, MEM 1x |
| <b>A549</b>         | Carcinoma do pulmão  | Epitelial                     | DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%, MEM1x  |
| <b>FIBROBLASTOS</b> | Derme humana         | Células bipolares e refrácuas | DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%, MEM 1x |

#### 3.2.2. Manutenção das células tumorais

As linhas celulares tumorais HCT116, A549 e MCF-7 e a linha celular não-tumoral de fibroblastos foram cultivadas em meio de cultura DMEM e a linha celular tumoral A2780 em RPMI, suplementado com 10% (v/v) de FBS, MEM 100x e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico penicilina – Estreptomicina (*Pen-Strep + Antimycotic*: 1000 unidades/ml de penicilina, 10000 µg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de antimicótico fungizone), designado por “meio de cultura completo”. As linhas celulares tumorais foram mantidas em frascos de cultura 75 cm<sup>2</sup> e os fibroblastos em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (SPL Life Sciences, Korea). Os frascos são incubados a 37 °C, 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99 % (v/v) de humidade relativa, numa estufa de CO<sub>2</sub> (SANYO CO<sub>2</sub> Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão).

As culturas foram sempre renovadas semanalmente quando atingiam uma confluência de cerca de 80%, que é determinada por visualização ao microscópio ótico invertido Olympus CXX41 (Olympus, Tóquio, Japão). Assim, aspirou-se o meio de cultura e adicionaram-se 3 mL ou 2 mL (frasco 75 e 25 cm<sup>2</sup>, respetivamente) de *Tryple<sup>TM</sup> Express* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA) de forma a destacar as células do frasco e incubou-se à temperatura ambiente. Após 5 minutos, foram adicionados 3 mL ou 2 mL de meio cultura fresco (a fim de neutralizar a ação da tripsina) e transferiu-se o volume total para os tubos Falcon

de 15 mL (SPL Life Sciences, Coreia), centrifugando-se a 500 g durante 5 minutos a 20°C (Sigma 3-16K 10280, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante obtido foi descartado e o *pellet* foi então ressuspensionado em 1 mL de meio completo.

As células foram contadas através do método de exclusão por azul de *Trypan* (Sigma, St. Louis, EUA), um corante que penetra nas células com a integridade membranar corrompida, corando-as de azul, e por um hemocitómetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha). Assim, preparou-se uma mistura contendo 350 µL de meio completo, 100 µL de azul *Trypan* a 0,2% (v/v) e 50 µL da suspensão celular obtida durante o processo de subcultura, recorrendo-se ao microscópio ótico para a realização da contagem do número de células. A densidade celular final (células/mL) foi obtida pela multiplicação do número total de células contadas, o volume da câmara do hemocitómetro ( $10^4 \text{ mL}^{-1}$ ) e o factor de diluição (10) a dividir pelo o número de quadrantes utilizados na contagem, estando representado na seguinte equação:

**Equação 3.1**

$$N^{\circ} \text{ células/mL} = \frac{N^{\circ} \text{ células totais contadas} \times 10 \times 10^4}{\text{Número de quadrantes}}$$

Aplicando a Equação 3.1, determinou-se o volume de suspensão celular necessário para adicionar a um novo frasco de cultura. No final, as células foram incubadas a 37°C, a 5% (v/v) CO<sub>2</sub> e 99% (v/v) de humidade relativa.

### 3.3. Avaliação da viabilidade metabólica

A avaliação metabólica das células após a exposição aos complexos foi neste trabalho interpretada como uma medida indirecta do seu potencial antiproliferativo. O ensaio foi realizado nas linhas celulares A2780, HCT116, A549, MCF-7 e na linha celular saudável fibroblastos. Utilizou-se o método colorimétrico, homogéneo *CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA), de forma a determinar o número de células viáveis na proliferação celular. O Kit *CellTiter 96* é composto por duas soluções: MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -5-(3-carboximetoxifenil) -2-(4-sulfonil) -2H-tetrazol) e PMS (metossulfato de fenazina).

Para o ensaio de viabilidade utilizou uma densidade celular de  $0,75 \times 10^5$  células/mL, determinada pelo método de exclusão obtido na secção 3.2.2. O volume da suspensão celular necessário para preparar a solução com essa densidade, foi diluído no meio completo apropriado. Desta suspensão, realizou-se o *seeding* de uma placa de 96 poços de fundo plano (SPL Life Sciences, Coreia), e incubou-se a 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> e 99% de humidade relativa por 24 horas. Antes da adição dos compostos, a placa foi observada ao microscópio invertido de forma a avaliar a aderência e a confluência (aproximadamente 80%) das células. Passadas 24h, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo as soluções com diferentes concentrações de complexo (0,5 a 100 µM) e com 0,1% de DMSO (controlo). Foi realizado ainda um controlo na viabilidade do ensaio de forma a observar se os compostos interferiam com o reagente MTS. Após a adição dos compostos a placa de 96 poços foi incubada a 37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99% (v/v) de humidade relativa por 48h.

Concluídas as 48 h, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular utilizando o kit *CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*. Assim, aspirou-se o meio de cultura de cada poço e adicionaram-se 100 µL de uma solução com meio de cultura completo e reagente MTS (20 µL de reagente :80 µL de meio completo) a cada poço. Após a incubação da placa durante 45 minutos a 37 °C, 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> e 99 % de humidade relativa leu-se a absorvância a 490 nm num leitor de microplacas Tecan Infinite F200 (Tecan, Männedorf, Suíça).

A conversão do MTS na sua forma aquosa solúvel, formazano, que absorve aproximadamente a 490 nm, ocorre na presença de desidrogenases mitocondriais, que se encontram presentes em células metabolicamente ativas. A quantidade de formazano produzido nesta reação é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes em cultura. A viabilidade celular (%) foi determinada através da aplicação da equação:

**Equação 3.2** 
$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{490}(amostra)}{Abs_{490}(controle)} \times 100$$

Cada ensaio foi realizado em triplicado\* para cada concentração de composto testada.

Os resultados estão expressos em valor de IC<sub>50</sub> relativo, calculado a partir do programa GraphPadPrism 6 (Graph Pad Software Inc., San Diego, Ca, USA). O IC<sub>50</sub> relativo corresponde à concentração de composto no ponto médio entre o patamar superior e o patamar inferior de uma curva de concentração-resposta, que para este estudo se considerou corresponder à concentração de composto necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (Neubig *et al.* 2003).

Estes ensaios foram igualmente realizados incubando a linha tumoral A2780 na presença de agentes quimioterapêuticos doxorrubicina e cisplatina, sendo que os resultados obtidos foram comparados com os respectivos valores obtidos para os complexos.

O Índice de seletividade (IS) demonstra a atividade diferencial de um complexo, ou seja, quando maior o valor de IS mais seletivo o complexo é para a linha tumoral em questão (Koch *et al.* 2005). O Índice de seletividade (IS) foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

**Equação 3.3** 
$$IS = \frac{IC_{50}\ do\ complexo\ na\ linha\ saudável}{IC_{50}\ do\ complexo\ numa\ linha\ tumoral}$$

### 3.4. Avaliação do potencial apoptótico

#### 3.4.1. Marcação com a sonda Hoechst 33258 e iodeto de propídio (IP)

A avaliação preliminar da capacidade indutora apoptose pelos complexos ACP19 e SA25 nas linhas tumorais A2780 e HCT116 realizou-se por microscopia de fluorescência através da marcação com a sonda Hoechst 33258 (*Phenol, 4-[5-(4-methyl-1-piperazinyl) [2,5'-bi-1H-benzimidazol] -2'-yl] -, trihydrochloride 23491-45-4*) e IP (Sigma, St. Louis Missouri, EUA). A sonda Hoechst 33258 tem uma grande afinidade para ácidos nucleicos (com comprimentos de onda de emissão e excitação quando ligando ao DNA, de 461 e 352 nm, respetivamente). A análise por microscopia de fluorescência de células marcadas com esta sonda permite a deteção de alterações morfológicas nucleares, condensação da cromatina e corpos apoptóticos (Elmore 2007; Cao *et al.* 2011). A marcação com IP, um agente fluorescente intercalante que apresenta uma alta afinidade para ácidos nucleicos (Mühlgassner *et al.* 2012) mas cuja entrada na célula está dependente da perda da integridade membranar, indicando apoptose tardia ou necrose (Brumatti *et al.* 2008).

---

\*Triplacados biológicos, realizados em dias diferentes com três leituras por ensaio dos quais se considerou o valor médio.

Antes de cultivar as células, as lamelas (VWR, Europe) foram mergulhadas em 70% (v/v) de etanol e foram deixadas a secar na placa de 24 poços (VWR, Europe). De seguida realizou-se uma lavagem de PBS 1x. As células foram cultivadas nas lamelas numa densidade celular de,  $0,75 \times 10^5$  células/mL, e incubadas a 37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99% de humidade relativa, por 24 h. Após este período, aspirou-se o meio das placas e foi substituído por uma solução com os complexos em estudo, com a concentração do IC<sub>50</sub>, ou 0,1% de DMSO (controlo), diluído em meio completo. Após as 48 horas de incubação nas mesmas condições descritas anteriormente, o meio foi retirado e as células foram lavadas três vezes com PBS 10x (Invitrogen, Nova Iorque, EUA) suplementado com 5% (v/v) de FBS (Sigma, St. Louis Missouri, EUA). Fixaram-se as células com 4% (v/v) de paraformaldeído (PFA; Invitrogen, Nova Iorque, EUA) e incubou-se à temperatura ambiente, na ausência de luz durante 20 min. De seguida, as células foram lavadas novamente três vezes com o PBS 10x suplementado. A cada poço foi adicionado 200 µL de uma solução de Hoechst 33258 (5 µg/mL), IP (25 µg/mL) em PBS 10x suplementado, incubando-se na ausência de luz e à temperatura ambiente durante 15 min. Após a incubação, repetiram-se as três lavagens com PBS 10 X suplementado e com PBS 1X. Adicionou-se uma gota de glicerol no centro da lamina, colocando cuidadosamente a lamela por cima. As laminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas através do Olympus DP50 (Olympus) acoplada ao microscópio. As fotografias foram adquiridas pelo *software AnalySIS Soft Imaging System* (Olympus). O ensaio realizou-se em triplicado.

### 3.4.2. Marcação com Anexina V – FITC e IP

A dupla marcação com Anexina V-FITC e IP é um ensaio específico e rápido para detetar apoptose por citometria de fluxo (Brumatti *et al.* 2008), permitindo identificar com especificidade as células em apoptose inicial, células em apoptose tardia e células em necrose (Brumatti *et al.* 2008). A proteína Anexina V liga-se com eficiência à fosfatidilserina (PS), um fosfolípido carregado negativamente que está presente no folheto interno da membrana celular e é externalizado na fase inicial da apoptose (Cao *et al.* 2011). A marcação com o IP está dependente da perda da integridade da membrana tal como referido acima (Brumatti *et al.* 2008).

Devido a dificuldades de marcação da Anexina V-FITC na linha celular A2780, este ensaio foi realizado na linhagem celular HCT116. As células foram cultivadas em placas de 35 mm, numa densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/mL, e incubadas a 37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99% de humidade relativa, por 24 h. Após este período o meio foi substituído pelo IC<sub>50</sub> dos complexos ou por 0,1% de DMSO (controlo) diluído em 1 mL de meio de cultura fresco. As células foram incubadas durante 48 h nas mesmas condições referidas anteriormente. Posteriormente as células foram coletadas por tripsinização e centrifugadas 1000 x g por 5 min à temperatura ambiente. O *pellet* resultante foi ressuspensionado duas vezes em 1 mL de PBS 1X frio para a lavagens das células, com centrifugações intercaladas a 1000 x g por 5 min à temperatura ambiente. Após as centrifugações, o sedimento obtido foram ressuspensionado em 100 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x, 5 µL de Anexina V conjugada com FITC e 2 µL de IP (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*; Invitrogen, USA), e incubados 15 min na ausência de luz à temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x e 500 µL de PBS 1X frio. A análise e quantificação das amostras foi realizada por citometria de fluxo no citómetro de fluxo Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) pela aquisição de 10000 eventos por amostra e a análise dos resultados foi realizada através do Attune® Cytometric software (Life Technologies). O ensaio foi realizado em triplicado\*.

---

\*Triplcados biológicos, realizados em dias diferentes com três leituras por ensaio dos quais se considerou o valor medio.

### 3.4.1. Avaliação do efeito dos compostos na morte celular autofágica

Para detecção de autofagia na linha celular A2780 foi utilizado o *CYTO-ID® Autophagy Detection Kit* (Enzo Life Sciences, Reino Unido). As células foram cultivadas nas mesmas condições descritas na secção 2.4.1. Após a incubação, o meio de cultura foi substituído por uma solução de meio fresco contendo o IC<sub>50</sub> dos complexos ou por 0,1% de DMSO (controlo). Incubaram-se as placas por 48 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>, e 99 % de humidade relativa. Após 12 h, o indutor de autofagia, rapamicina (50 mM), foi adicionado ao poço correspondente. Após as 48 h de incubação dos compostos, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 10x suplementado com 5% (v/v) de FBS. As células foram coradas com uma solução de coloração de autofagia que contém Hoechst 33342 (1 mg/L) (com comprimentos de onda de emissão e excitação quando ligando ao DNA, de 480 e 340 nm, respetivamente), Cyto-ID® Green, (com comprimentos de onda de emissão e excitação de 530 e de 488 nm, respetivamente) (Enzo Life Sciences, USA) e PBS 10x suplementado e incubadas durante 30 min a 37°C. Após o período de incubação as células foram lavadas três vezes com PBS 10x suplementado. As células foram fixadas na lamela com 4% (v/v) de PFA durante 20 min à temperatura ambiente, na ausência de luz, seguindo de três lavagens com o PBS 10x suplementado. Adicionou-se uma gota de glicerol no centro da lamina, colocando cuidadosamente a lamela por cima. As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas através do Olympus DP50 (Olympus) acoplada ao microscópio. As fotografias foram adquiridas pelo *software AnalySIS Soft Imaging System* (Olympus). O ensaio realizou-se em triplicado \*.

### 3.4.2. Avaliação do efeito sobre o potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi M$ )

O potencial de membrana mitocondrial determina a captação seletiva de JC-1 pela mitocôndria. O JC-1 é um catião lipofílico que existe em duas formas, monómeros e agregados, consoante o estado de polarização/despolarização da membrana mitocondrial, emite fluorescência a comprimentos de onda diferentes. Quando o potencial de membrana é elevado, forma agregados que emitem fluorescência vermelha (590nm). Quando o potencial de membrana mitocondrial diminui, ou em casos que a membrana está despolarizada, o JC-1 é excluído da mitocôndria, e mantém-se no citoplasma sob a forma de monómeros emitindo fluorescência verde (527 nm). A razão entre a fluorescência verde e vermelha, fornece uma estimativa do potencial de membrana (Castedo *et al.* 2002).

A alteração do potencial da membrana mitocondrial foi avaliada pela utilização do kit que contém uma sonda fluorescente catiónica lipofílica JC-1 (*5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide*) (JC-1; Abnova Corporation, Walnut, CA, USA). A linha celular A2780 foi cultivada em placas de 8 poços (SPL Life Sciences, Coreia) a uma densidade celular de 0,75 x 10<sup>5</sup> células/mL, e incubadas a 37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99% de humidade relativa, por 24 h. Após a incubação o meio foi substituído por soluções dos complexos ao seu IC<sub>50</sub> ou por 0,1% de DMSO (controlo, veículo), diluídas a partir da solução-stock de cada complexo com meio de cultura fresco e foram incubadas durante 48h. Para a avaliação da intensidade de fluorescência, as células foram marcadas com uma solução de coloração JC-1 durante 20 min a 37°C na ausência de luz. Após este período as células foram visualizadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas através do Olympus DP50 (Olympus) acoplada ao microscópio.

---

\*Triplcados biológicos, realizados em dias diferentes com três leituras por ensaio dos quais se considerou o valor medio.

As laminae foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas através da câmara Olympus DP50 (Olympus) acoplada ao microscópio. As fotos foram analisadas pelo *software* ImageJ National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA) e a razão de emissão verde/vermelho foi determinada para cada amostra. O ensaio realizou-se em duplicados independentes.

### 3.4.3. Análise dos níveis das proteínas pró- e anti-apoptóticas por *Western Blot*

#### 3.4.3.1. Preparação das amostras

Para a extração de proteínas, as células A2780 foram cultivadas em frascos de cultura 75 cm<sup>2</sup> a uma densidade celular de  $4 \times 10^6$ , nas mesmas condições mencionadas na secção 2.2. Após 24 h o meio foi substituído por uma solução com os complexos em estudo com a concentração do IC<sub>50</sub>, ou 0,1% de DMSO (controlo), diluído em meio completo. Após 48h de incubação, as amostras com as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e recolhidas com um raspador para um microtubo em gelo. As amostras foram centrifugadas a 500 x g, por 5 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. De seguida, o *pellet* resultante foi ressuscitado em PBS 1 x e centrifugou-se a 900 x g por 5 min a 4°C, de forma a que todo o PBS seja removido, realizou-se um *spin* final. Todas as amostras foram ressuscitadas em 100 µL de uma solução de lise celular contendo o tampão NaCl-Tris-EDTA (NaCl 150mM; 50 mM Tris, pH=8; EDTA 5 mM), inibidores de fosfatase 1x (PhosStop, Roche), inibidores de proteases 1x (complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche, Suíça), 0,1% (p/v) de ditioneitol (DTT; AMRESCO, USA), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Sigma, St. Louis, EUA) e 2% (p/v) de NP-40 (Thermo Scientific, MA, EUA). As amostras foram armazenadas a -80°C, até processamento posterior. Após o descongelamento, todas as amostras foram submetidas a pulsos contínuos no banho de ultrassons em gelo, durante 2 min 30 s e mantida em gelo durante 1 minuto de forma a evitar o aquecimento da amostra. Após estes ciclos, os lisados celulares foram centrifugados a 8000 x g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram recuperados.

Para a quantificação da proteína, utilizou-se o *Pierce Protein Assay kit* (Thermo Scientific, MA, USA). Numa primeira fase, foi estabelecida uma curva de calibração com várias soluções padrão de BSA de 0 a 1000 µg/mL (Thermo Scientific, MA, USA) e os extratos de proteína foram diluídos numa proporção de 1:10 em água ultrapura ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  a 25°C). Sequencialmente adicionou-se 150 µL do reagente de Pierce e incubou-se durante 5 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. A absorvância das amostras foi medida através do leitor de microplacas *Tecan Infinite F200* (Tecan, Männedorf, Suíça) a 660 nm. Após a quantificação, 50 µg foram transferidos para outro microtubo juntamente com o tampão de dodecilsulfato de Sódio (SDS) a 4x e 3% (p/v) de DTT. As amostras foram fervidas a 90°C durante 1 min e colocadas em gelo após esse período. Antes de colocar as amostras no gel foi adicionado 1 µL de 30% (p/v) DTT em todas as amostras.

#### 3.4.3.2. SDS-PAGE e transferência para a membrana de nitrocelulose

Preparou-se um gel de SDS-PAGE e correu-se as amostras a 120 V e 50 mA durante 1 h. Após a conclusão do SDS-PAGE, realizou-se a transferência eletrónica para uma membrana de nitrocelulose. Preparou-se uma sanduiche de transferência, em que o gel estava em contacto com a membrana, entre um par de folhas de papel de filtro e esponjas. Após a montagem do dispositivo, o reservatório foi preenchido com tampão de transferência frio (25 mM Tris, 192 mM de Glicina, 20 % (v/v) metanol, pH= 8,3) até que a sanduiche estivesse completamente coberta. A transferência ocorreu durante a noite a 4°C a 40 V e para finalizar 1h a 100 V.



#### 3.4.3.3. Incubação com anticorpo primário e secundário

A membrana possui uma alta afinidade por proteínas, por isso, de forma a bloquear ligações não específicas à proteína, foi necessário incubar a membrana com um agente de bloqueio. Assim, a membrana foi bloqueada com uma solução de bloqueio com 5% de leite em pó desnatado em tampão TBST 1x (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,1% (v/v) de Tween 20, pH= 7,5) e incubada durante 1 h, à temperatura ambiente (TA) em constante agitação. De seguida, cada membrana de nitrocelulose foi exposta a diferentes anticorpos primários em 5 % de leite não gordo em TBST. Nomeadamente, anti-Bax (1:5000; Abcam, Reino Unido), anti Bcl-2 (1:1000; Sigma, St. Louis, EUA) e anti-PARP (1:500; Thermo Scientific, MA, USA) e foi deixado a incubar durante 1 h à TA, com constante agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBST 1x durante 5 minutos, com constante agitação. O mesmo procedimento foi aplicado à membrana com a incubação do anticorpo secundário (1:3000, *Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase (HRP)-linked Antibody* ou 1:2000, *Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody*; Cell Signalling Technology, USA). Todas as membranas foram incubadas com o tampão *stripping* (0,1M de glicina, 20 mM de acetato de magnésio e 50 mM de cloreto de potássio) e, em seguida, foram incubadas com anti  $\beta$ -actina ((1:5000; Sigma, St. Louis, EUA) como um controlo para a normalização de resultados.

#### 3.4.3.4. Exposição do filme

De forma a detetar as bandas das proteínas na membrana, foi preparado o substrato de *WesternBright ECL* (Advansta, USA). O ECL é um substrato quimioluminescente para a deteção da atividade da peroxidase de rabano (HRP) a partir de anticorpos secundários. A membrana foi totalmente coberta pelo o substrato e incubada durante 5 min. Sequencialmente, o filme foi exposto à membrana, num quarto escuro. A quantificação das bandas de proteínas foi determinada usando o *software ImageJ*. Os resultados apresentados são referentes a duas experiencias independentes.

#### 3.4.4. Deteção da produção intracelular das espécies reativas de oxigénio

A oxidação da diclorofluoresceína diacetato ( $H_2DCF$ -DA) (*Molecular Probes: Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA) intracelular tem sido utilizada de forma a detetar a presença de espécies reativas de oxigénio (ROS) nas células. Quando o  $H_2DCFDA$  é oxidado por peróxidos origina uma forma oxidada fluorescente chamada 2,7-diclorofluorescina (DCF), que pode ser detetada pelo monitorização do aumento de fluorescência intracelular (Gomes *et al.* 2005).

As células A2780 foram cultivadas em placas de 8 poços (SPL Life Sciences, Coreia) a uma densidade celular de  $0,75 \times 10^5$  células/mL, e incubadas a 37°C, 5% (v/v) de  $CO_2$  e 99% de humidade relativa, por 24 h. Após a incubação o meio foi substituído por uma solução de meio fresco contendo o  $IC_{50}$  dos complexos ou por 0,1% de DMSO (controlo), meio fresco correspondente as células não tratadas e 25  $\mu$ M de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$  - controlo positivo). Após a incubação de 48 h, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x e incubadas com 100 mM de  $H_2DCF$ -DA em PBS 1x aquecido durante 20 min a 37°C, na ausência de luz. Após este período, realizou-se três lavagens com PBS1x de forma a eliminar o  $H_2DCF$ -dA não ligado. De seguida, fixou-se as células com 4% (v/v) de PFA e incubou-se durante 20 min à temperatura ambiente. A fluorescência do DCF foi visualizada e fotografaram-se as células em campo claro e em fluorescência, num microscópio Olympus BX51. As imagens foram analisadas no *software ImageJ*, sendo os resultados representados como a média da intensidade de fluorescência, que corresponde à quantidade de ROS produzido nas células. Os resultados apresentados resultam da média de duas experiências independentes.

### 3.5. Localização subcelular

Para a realização do fracionamento subcelular, as células A2780 foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> a uma densidade celular de  $1 \times 10^6$  células/frasco e incubadas a 37°C, a 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99 % de humidade relativa. Após a incubação de 24 h, o meio foi substituído por 5 mL de meio fresco contendo 40 µM dos complexos, e foram incubadas durante 6 h a 37°C, a 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99 % de humidade relativa. Após a incubação as células foram tripsinizadas com *TrypLE<sup>TM</sup> Express* e as frações citosólicas, mitocondriais e nucleares foram isoladas sequencialmente usando o *Cell Fractionation Kit-Standard* (Abcam, Cambridge, MA), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas por ICP-MS, através de um serviço contratado (Laboratório de análises, serviço de espectroscopia de emissão atómica, Departamento de Química, FCT-UNL), de forma a determinar a quantidade de metal presente na amostra.

### 3.6. Progressão do ciclo celular

O impacto dos compostos no ciclo celular foi analisado através de citometria de fluxo analisando o conteúdo do DNA das células coradas com IP.

Para a análise da progressão do ciclo celular utilizou-se a linha celular HCT116, devido às dificuldades obtidas na análise da progressão do ciclo celular na linha A2780. As células foram cultivadas em placas de 35 mm na densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/mL, e incubadas a 37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99% de humidade relativa, por 24 h. As células foram sincronizadas por um duplo bloqueio com timidina (Sigma, St. Louis, USA), um bloqueador de fase S comum usado para parar e sincronizar as células no início da fase S (Bostock *et al.* 1971). Após 8 h de cultivar as células, o primeiro bloqueio foi realizado com a adição de 2 mM de timidina no meio de cultura, incubando por 16 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99% de humidade relativa. As células foram posteriormente mantidas em meio de cultura sem timidina por 10 h, nas mesmas condições descritas anteriormente. Seguidamente adicionaram-se 2 mM de timidina (2º bloqueio), e as células foram incubadas por 14 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99 % de humidade relativa. Após este período de incubação, removeu-se o meio com timidina e procedeu-se à exposição das células ao IC<sub>50</sub> dos complexos em estudo, ou 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo), com incubação a 37 °C, 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99 % de humidade relativa, por 4, 9, 12 e 24 h. As células de uma das culturas foram fixadas, de acordo com o protocolo seguinte, imediatamente após a terminação do segundo bloqueio (0 h) e utilizadas como controlo do método de sincronização. Após cada período de tempo as células foram tripsinizadas com *TrypLE<sup>TM</sup> Express* e centrifugadas a 1000 x g por 5 min a 4°C, com posterior eliminação dos sobrenadantes. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1x frio e centrifugadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 1 mL de PBS 1x frio, adicionando-se, posteriormente, gota a gota, 1 mL de uma solução de Etanol a 80% (v/v) com agitação suave, para a fixação das células. As amostras foram mantidas em gelo durante 30 minutos, e de seguida armazenadas a 4°C no mínimo durante 18 h. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1000 x g a 4°C. O sobrenadante foi removido e ressuspendido numa solução de 50 µg/mL de RNase A em PBS 1x e incubados durante 30 min a 37 °C. Adicionou-se iodeto de propídio a cada microtubo para uma concentração final de 2,5 µg/mL. A análise do conteúdo do DNA foi realizada no citómetro de fluxo *Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) pela aquisição de 10000 eventos por amostra e a análise dos resultados foi realizada através do *software FCS Express 6 Flow Cytometry*. Os resultados finais resultam da média de dois ensaios biológicos independentes.

### 3.7. Estudos *in vitro* da interação dos complexos com o DNA

A interação dos complexos de ruténio com o DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, usando o DNA do plasmídico UC18 (pDNA) e por espectroscopia de UV-visível e de Dicroísmo Circular, usando o DNA de timo de bezerro (*calf thymus*-DNA ou CT-DNA).

#### 3.7.1. Estudo da clivagem do DNA Plasmídico

##### 3.7.1.1. Cultura de *Escherichia coli* e extração do DNA plasmídico

O estudo da clivagem do DNA plasmídico foi realizado recorrendo ao plasmídeo UC18. O DNA plasmídico (pDNA) foi obtido a partir das células transformadas de *Escherichia coli*, que foram cultivadas em meio *Luria-Bertani* (LB; Applichem, Darmstadt, Alemanha) suplementado com ampicilina (100 µg/mL; Bioline, EUA) com agitação orbital de 250 rpm, por um período de 16 h a 37 °C.

De seguida, o DNA plasmídico foi extraído utilizando o *kit* de extração *NZYMiniprep* (Nzytech, Lisboa, Portugal), segundo as instruções do fabricante. O DNA plasmídico foi quantificado medindo a absorvância a 260 e a 280 nm no espectrofotómetro *Nanodrop2000*. A pureza do DNA plasmídico foi avaliada, através das razões Abs260/Abs280 e Abs260/Abs230. A razão Abs260/Abs280 deve apresentar um valor de aproximadamente 1,8 em amostras de DNA puras (NanoDrop Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007), enquanto que a razão Abs260/Abs230 deve apresentar um valor entre 2,0 e 2,2 (NanoDrop Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007). O pico de absorvância dos ácidos nucleicos é 260nm, das proteínas 280 nm e de contaminantes como os sais e compostos orgânicos a 230 nm. Portanto estas razões permitem avaliar a contaminação de proteínas (Abs260/Abs280) e de outros compostos (Abs260/Abs230).

#### Eletroforese do DNA plasmídico

A interação *in vitro* entre os complexos e o DNA foi realizada num microtubo contendo 100 ng de pUC18 e a diferentes concentrações de composto (0 a 100 µM), diluído em tampão (5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7) a um volume final de 20 µL e as soluções foram incubadas durante 6 h a 37 °C. As amostras de controlo foram utilizadas na mesma proporção usadas com o composto e nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O mesmo protocolo foi seguido para o pUC18 numa mistura com o tampão Hind III (Ferments, Maryland, EUA), pUC18, enzima de restrição Hind III (10 U/µL; Ferments, Maryland, EUA), que foi utilizada para a digestão da forma super-enrolada do DNA e a água ultrapura (18.2 MΩ.cm<sup>-1</sup> a 25°C), incubados durante 2 h a 37° C. Após o tempo de incubação a reação foi interrompida com a adição de 5 µL do *loading buffer* (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8; 50 % de glicerol e 0,1 % de azul bromofenol. A integridade do DNA plasmídico foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v), em solução tampão TAE 1x (Anexo B), corado com 2 % (v/v) de *GelRed*, a 80 V durante 2 h. Como marcador de pesos moleculares foi utilizado λ DNA/HindIII. Os resultados foram visualizados usando *Molecular Imager® Gel Doc™ XR*, com *Image Lab™ Software* (BioRad, Berkley, California) e a imagem foi obtida pelo *software GelDoc*. Os resultados apresentados correspondem a três ensaios independentes.

#### 3.7.2. Espectroscopia de Absorção

A espectroscopia de absorção UV-Vis é uma técnica simples e muito comum para estudar a interação da molécula de DNA com um composto (Sirajuddin *et al.* 2013). A interação dos complexos com o DNA foi avaliada utilizando o DNA de timo de bezerro (CT-DNA; Invitrogen, Nova Iorque, EUA). A

concentração de CT-DNA, por nucleótido, foi determinada por espectrofotometria, através da leitura de absorvância a 260 nm no NanoDrop2000 usando o coeficiente de extinção molar de 6600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Lawrence *et al.* 2006). A interação foi estudada por titulação de soluções de complexo com CT-DNA. Para a realização das titulações, utilizou-se uma concentração constante de complexo de 25 µM (0,1% (v/v) DMSO) na ausência e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (entre 0 e 100µM). Todas as amostras foram preparadas em tampão 5 mM Tris-HCl (Merck), 50 mM NaCl (Panreac), pH 7 e incubadas durante 6 h a 37°C. Para o controlo efetuou-se em simultâneo a titulação de uma solução de CT-DNA com DMSO, nos mesmos volumes/proporções que as mesmas usadas com os compostos. Os espectros de absorção foram adquiridos num espectrofotómetro Evolution 300 UV-Vis (Thermo Scientific), na região do UV-Vis (entre 250 e 800 nm), à temperatura ambiente. Na cuvette de referência, contendo o tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7, adicionaram-se concentrações de CT-DNA crescentes.

Os valores de absorvância a 340 nm no caso do ACP19 e a 450 nm no caso do SA25, correspondentes a um máximo local de absorvância, foram utilizados na determinação do valor da constante de afinidade para o DNA (Kb), pela aplicação da equação 3.4 (Sirajuddin *et al.* 2013).

**Equação 3.4**

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon a - \epsilon f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon b - \epsilon f)} + \frac{1}{Kb(\epsilon b - \epsilon f)}$$

onde, [DNA] corresponde à concentração de DNA,  $\epsilon a$  ao coeficiente de extinção molar aparente,  $\epsilon f$  ao coeficiente de extinção molar do composto no estado livre,  $\epsilon b$  ao coeficiente de extinção molar do composto ligado ao DNA e Kb à constante de afinidade para o DNA (M<sup>-1</sup>)(Sirajuddin *et al.* 2013). O valor de  $\epsilon f$  foi obtido através da equação de Lambert-Beer, pela determinação do declive de uma reta de calibração ajustada à dependência da absorvância a 291 nm com a concentração de complexo em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.  $\epsilon a$  foi calculado a partir da razão Aobs/[complexo]. A constante Kb foi determinada pela razão entre o declive (1/(\epsilon b - \epsilon f)) e a ordenada na origem (1/Kb(\epsilon b - \epsilon f)) de uma reta resultante de um ajuste linear à representação de [DNA](\epsilon a - \epsilon f) em função de [DNA] (equação 3.4) (Agarwal *et al.* 2012; Sirajuddin *et al.* 2013). Para o cálculo da constante de ligação, foi necessário assumir que apenas um tipo de ligação ocorre entre o DNA e o composto em solução aquosa resultando na formação de um tipo de complexo. Além disso, é presumido que o substrato e o ligando seguem a lei de Lambert-Beer na gama de concentrações envolvida (Agarwal *et al.* 2012). O ensaio foi realizado em triplicado.

### 3.7.3. Dicroísmo circular

A interação entre o complexo ACP19 e o CT-DNA foi analisada por dicroísmo circular (CD). Todos os espectros foram obtidos pelo Chirascan™ (AppliedPhotophysics, Reino Unido) à temperatura ambiente, na gama de comprimento de onda de 230-600 nm. A concentração de complexo utilizado na experiência foi de 25 µM, na ausência e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (12,5;25,0 e 35,0 µM). Todas as amostras foram preparadas em tampão 5 mM Tris-HCl (Merck), 50 mM NaCl (Panreac), pH 7 e incubadas durante 6 h a 37 °C. A linha de base (Tampão 5mM Tris-HCL, 50 mM NaCl, pH7) foi automaticamente descontada aos espectros. Para o controlo efetuou-se em simultâneo a titulação com DMSO de uma solução de CT-DNA, nos mesmos volumes/proporções que as mesmas usadas com os compostos. Os resultados apresentados foram obtidos de duas experiências independentes.

### 3.8. Interação com a albumina sérica: BSA e HSA

A albumina do soro bovino (BSA) e albumina do soro humano (HSA) atuam como transportador de muitos compostos pelo plasma sanguíneo e são frequentemente utilizadas como modelos para o estudo da ligação do composto a proteínas globulares (Luís *et al.* 2014; Li *et al.* 2011).

O estudo da interação do complexo ACP19 com a BSA e HSA foi efetuado seguida por espectroscopia de UV-visível. Prepararam-se várias soluções com uma concentração constante de BSA ou de HSA (Sigma, St. Louis, USA) (2 µM), e a concentração de complexo variou entre 10,0; 15,0; 17,5 e 25,0 µM, diluídas em tampão fosfato de 10 mM e 0,15M NaCl, pH 6,0. O espectro UV-Vis para a interação entre o complexo e as proteínas foi obtido (de 250 a 500 nm) como mencionado na secção 2.7.2, com o tempo de incubação de 1 h (a 4°C) e 24 h (a 37°C). As soluções de referência, contendo apenas o complexo, nas mesmas proporções utilizadas, foram também preparadas e os seus espectros adquiridos. O ensaio foi realizado em triplicado.

De forma a determinar a constante de ligação, para o complexo {BSA-ACP19} (1:1) e para o complexo {HSA-ACP19} (1:1), utilizou-se a equação de Benesi-Hildebran através da diferente absorvância a um comprimento de onda fixo ( $\lambda = 289 \text{ nm}$ ):

**Equação 3.5**

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{(\epsilon b - \epsilon f)L\tau} + \frac{1}{(\epsilon b - \epsilon f)L\tau K_a} \frac{1}{M}$$

onde,  $\epsilon f$  é o coeficiente de extinção molar do composto no estado livre,  $\epsilon b$  é o coeficiente de extinção molar do composto ligado,  $L$  a concentração total de BSA,  $M$  é concentração do composto, e  $\Delta A$  é a variação de absorvância num certo comprimento de onda. Ao traçar o gráfico de  $1/\Delta A$  vs  $1/[ACP19]$ , a constante de ligação  $K_b$  pode ser determinada pela razão entre o declive e a ordenada na origem (Molina-bolívar *et al.* 2014).

### 3.9. Proteómica: eletroforese bidimensional (2-DE)

#### 3.9.1. Preparação da amostra, precipitação e purificação

As células A2780 foram cultivadas em frascos de cultura 75 cm<sup>2</sup> a uma densidade celular de  $4 \times 10^6$ , e incubadas nas mesmas condições descritas na secção 2.4.4.1. O lisado celular foi centrifugado a 8000 x g, durante 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram recuperados. A precipitação e a purificação dos extratos de proteínas total foi realizado com o *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, à exceção do passo de adição do *wash buffer* e do *wash additive*, em que foi efetuada uma incubação *overnight* a -20°C. Posteriormente, também foi realizado uma lavagem adicional, onde 25 µL de água ultrapura ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  a 25°C) foi adicionado de forma a dispersar o *pellet*. O *wash buffer* e o *wash additive* foram adicionados nas mesmas proporções, de acordo com o protocolo do fabricante. Após a centrifugação, os sedimentos foram ressuspensos em 130 µL de uma solução de reidratação contendo 7 M de Ureia (BDH Prolabo, VWR International), 2 M Tioreia (Merck, Frankfurt, Alemanha), 2 % (p/v) de CHAPS (GE Healthcare, Reino Unido), inibidores de fosfatases 1x, inibidores de proteases 1x, vestígios de azul de bromofenol (Merck, Frankfurt, Alemanha), 0,1 % (p/v) de DTT e 1 mM PMSF. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante pelo menos 2 h. Por fim, centrifugaram-se as amostras a 8000 x g durante 10 min, recuperando os sobrenadantes. O extrato de proteínas total foi quantificado imediatamente antes da focagem isoeétrica utilizando o *Pierce Protein Assay Kit*, descrito na secção 2.4.4.1

### 3.9.2. Eletroforese bidimensional (2-DE): Focagem isoeletrica e SDS-PAGE

A eletroforese bidimensional permite a separação das proteínas através de duas etapas: a focagem isoeletrica e a eletroforese em géis de SDS-PAGE. A focagem isoeletrica, ou 1ª dimensão, permite a separação das proteínas consoante o seu ponto isoeletrico. A 2ª dimensão, realizada pela utilização de géis SDS-PAGE, permite a separação das proteínas de acordo com a sua massa molecular.

Para a realização da focagem isoeletrica utilizaram-se 90 µg do extrato proteico total. O volume correspondente aos 90 µg de extrato de proteína total foi distribuído ao longo do suporte de tiras de 7 cm *IPG strip holder* (GE Healthcare, Reino Unido), ressuspenso em 125 µL de uma solução de reidratação suplementada com 0,5 % de IPG (GE Healthcare, Reino Unido) e 0,5 % de *destreak* (GE Healthcare, Reino Unido). Após a distribuição colocou-se por cima uma tira *Immobiline Dry strip* pH 3-10 NL de 7 cm (GE Healthcare, Reino Unido), de modo que o gel ficasse em contacto com a amostra e não se formassem bolhas entre o gel e a amostra. Selou-se o suporte com 750 µL de *Drystrip Cover Fluid* (GE Healthcare, Reino Unido) e colocou-se a respetiva tampa. Os suportes foram posteriormente dispostos no sistema de isofocagem ETTAN IPGphor 3 IEF (GE Healthcare, Reino Unido), e a focagem isoeletrica foi realizada através do programa indicado na Tabela 2.3.

Tabela 3.3 – Programa utilizado na focagem isoeletrica (IEF)

| Passo | Duração | Voltagem (V) | Temperatura (°C) |
|-------|---------|--------------|------------------|
| 1     | 14h     | 30           | 20               |
| 2     | 30 min  | 100          |                  |
| 3     | 30 min  | 500          |                  |
| 4     | 30 min  | 1000         |                  |
| 5     | 15 min  | 5000         |                  |

Após a IEF, as tiras foram removidas dos suportes e equilibradas, durante 15min com agitação horizontal, em 5 mL de solução de equilíbrio (70 mM de Tris-HCl pH 8,8 (Merck), 6 M de ureia (Scharlau), glicerol 30 % (v/v) (Panreac) e 2% (p/v) de dodecil-sulfato de sódio (GE Healthcare, Reino Unido), suplementada com 1% (p/v) de DTT. De seguida, as tiras foram transferidas para uma nova solução de equilíbrio suplementada com 2,5% (p/v) de iodocetamida (GE Healthcare, Reino Unido) onde permaneceram durante 15 min com agitação horizontal.

Para a segunda dimensão da eletroforese bidimensional, prepararam-se géis de poliacrilamida a 12,5 % (v/v) contendo: 4,8 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30 % (Merck), 3 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 4,2 mL de água ultrapura (18.2 MΩ.cm-1 a 25 °C), 90 µL de persulfato de amónia a 10% (v/v) (APS, do inglês: Ammonium Persulfate; Biorad, Califórnia, EUA) e 12 µL tetrametiletilenodiamina (TEMED, do inglês *tetramethylethylenediamine*; Sigma, St. Louis, EUA). Após a polimerização do gel, as tiras foram colocadas por cima dos géis de poliacrilamida, juntamente com o marcador de pesos moleculares *NZY Colour Protein Marker II* (NZYTech, Lisboa, Portugal), selando-se de seguida com uma solução de agarose 0,5 % (p/v) (Lonza, Basel, Suíça) em tampão de eletroforese (3,79 g/L de Tris-base, 18 g/L de glicina (Panreac), 1,25 g/L SDS e vestígios de azul de bromofenol). O sistema de SDS-PAGE Mini-PROTEAN®3 System (BioRad) foi utilizado para na corrida da eletroforese, durante 30 min a 30 V e seguidamente a 120 V até o azul de bromofenol ser eliminado para o tampão de eletroforese.

### 3.9.3. Revelação dos géis

Os géis resultantes foram corados a quente numa solução contendo três pastilhas de PhasTGel™ Blue R (Coomassie R350) (GE Healthcare) dissolvidas em 1 L de ácido acético a 10 % (v/v) (Panreac) em água destilada, sendo aquecidos em intervalos de 30 min por três vezes. Para a revelação dos géis realizaram-se várias lavagens com água ultrapura (18.2 MΩ.cm-1 a 25 °C), aquecida nas mesmas condições referidas anteriormente. Os géis foram digitalizados através do scanner PIXMA M250 (Canon) e analisados no programa Melanie 7.0 (GeneBio, Genebra, Suíça). A análise foi realizada por deteção automática dos spots, identificação dos spots de proteínas, correspondência dos spots entre os diferentes géis e determinação da intensidade/expressão de cada spot. A variação dos níveis de expressão de cada proteína foi calculada a partir da razão entre a intensidade de cada um dos spots das amostras pela intensidade de cada um dos spots dos controlos. Os níveis de expressão <0,7 (sub-expressão da proteína) e > 1,5 (proteína sobre-expressão) foram considerados significativos.

### 3.10. Significância estatística

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM em três ensaios independentes. GraphPadPrism 6 software foi utilizado na análise dos resultados através *One ou Two-way ANOVA* ou *Student's t-test* de forma a comparar o grupo de controlo com os grupos tratados para a significância estatística. Resultados com um  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4. Resultados

Neste trabalho testaram-se quatro complexos e quatro ligandos (Esquema 1), nomeadamente os ligandos da família das tiossemicarbazonas HL1 (ou TSC-IndNCH<sub>3</sub>), HL2 (ou TSC-BTPHene), HL3 (ou TSC-BzOCH<sub>2</sub>Ph) e HL4 (ou TSC-BzCH<sub>2</sub>OH) e os respetivos complexos de Ru(II), [Ru(bpy)<sub>2</sub>(HL1)] [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**ACP19**), [Ru(bpy)<sub>2</sub>(HL2)] [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**SA25**), [Ru(bpy)<sub>2</sub>(HL3)] [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**SA22**) e [Ru(bpy)<sub>2</sub>(HL4)] [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**SA23**).

A síntese e caracterização completa dos complexos e ligandos foi realizada anteriormente (Assis 2015; Poeta 2015), assim como a avaliação da sua solubilidade e estabilidade química. Estes resultados anteriores demonstraram que nenhum dos complexos era solúvel em água sem adição de um co-solvente orgânico apropriado.

Muitos dos compostos utilizados na procura de novos fármacos têm baixa solubilidade e podem precipitar, não serem estáveis em solução ou serem estáveis por um tempo limitado se forem submetidos a diversas condições experimentais. Visto isto, é necessário perceber se os complexos iniciais mantêm a sua integridade estrutural em ensaios biológicos. Uma concentração de complexo inferior à esperada dificulta a determinação do IC<sub>50</sub> correto (Cheng *et al.* 2003).

Os solventes orgânicos são geralmente utilizados na dissolução de compostos hidrofóbicos com o propósito de serem usados nos ensaios biológicos. O DMSO ajuda a solubilizar compostos em tampões aquosos, mas pode também interferir com o ensaio em si. A tolerância das células ao DMSO varia largamente de ensaio para ensaio. Na maioria das linhas celulares o DMSO é bem tolerado até a uma percentagem de 1% (Di & Kerns 2006). Alguns compostos não são estáveis em DMSO, o que leva à necessidade de encontrar outros co-solventes para a dissolução dos compostos na fase dos ensaios biológicos. Dois dos solventes apresentados na literatura como alternativa ao DMSO, são o etanol e o metanol. O etanol é bem tolerado pelas linhas celulares, desde que esteja em concentrações inferiores a 0,5% (v/v) (Jamalzadeh *et al.* 2016). No entanto, é sempre necessário utilizar o solvente como controlo de forma a avaliar se o efeito observado é de facto devido à ação do complexo ou se é devida ao co-solvente usado como veículo (Di & Kerns 2006).

Nos estudos prévios destes complexos tinha-se verificado que o ACP19 e o SA25 são solúveis em DMSO e que apresentam uma boa estabilidade neste solvente, pelo que o DMSO foi identificado como um co-solvente adequado para a sua solubilização em meios aquosos (Poeta 2015). Em relação aos complexos SA22 e SA23 verificou-se que são solúveis em etanol. (Assis 2015)(Assis 2015; Poeta 2015). Optou-se por solubilizar os ligandos no co-solvente utilizado para o respetivo complexo.

Numa primeira fase, avaliou-se o efeito antiproliferativo dos quatro complexos e respetivos ligandos. Estes resultados foram utilizados para selecionar os complexos mais promissores para um estudo mais detalhado da sua ação biológica, dado o elevado custo envolvido.

### 4.1. Avaliação da viabilidade metabólica

A avaliação do potencial citotóxico de novos compostos recorrendo à utilização de linhas celulares tumorais constitui o primeiro passo na avaliação da sua potencial ação antiproliferativa (Wang *et al.* 2010; Toole *et al.* 2003).

A atividade antiproliferativa *in vitro* dos complexos e respetivos ligandos foi avaliada em quatro linhas celulares tumorais, nomeadamente A2780, HCT116, A549 e MCF-7, correspondentes ao carcinoma do ovário, carcinoma colorectal, carcinoma do pulmão e adenocarcinoma da mama, respetivamente.



Aplicaram-se concentrações crescentes dos complexos e respectivos ligandos, com um período de exposição de 48 h (Figuras 4.1, Figura 7.1-7.16 do Anexo A). A partir destes resultados foi possível determinar o valor de IC<sub>50</sub> relativo, pelo ajuste da curva concentração-resposta aos pontos experimentais de viabilidade celular (em %) com um patamar superior (100% viabilidade face ao controlo) e um patamar inferior (0% viabilidade). Os valores do IC<sub>50</sub> relativo encontram-se na Tabela 4.1.

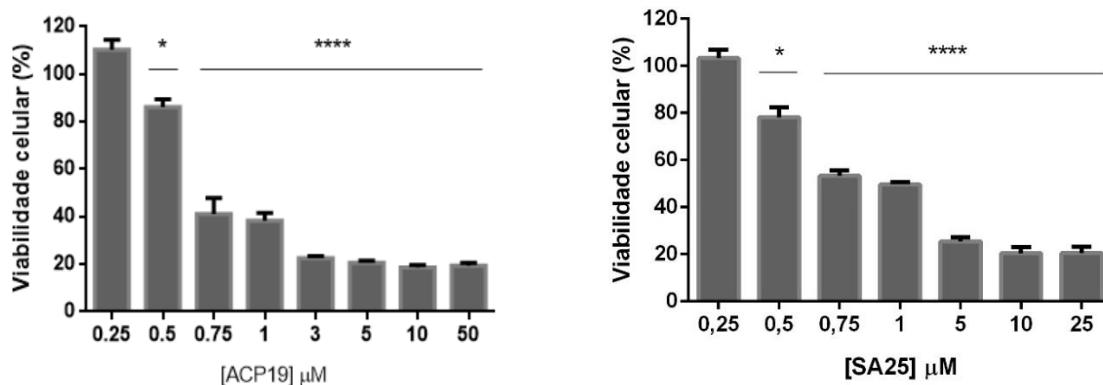
**Tabela 4.1 – Atividade citotóxica, quantificada como IC<sub>50</sub> relativo para os complexos e ligandos em estudo, nas linhas celulares A2780, HCT116, A549, MCF-7 e fibroblastos.** A atividade antiproliferativa foi avaliada após 48h de exposição. Os dados representados estão expressos como média ± SEM de três ensaios biológicos independentes. (NC: Não citotóxicos, com um IC<sub>50</sub> superior a 90 µM)

|              | IC <sub>50</sub> relativo (µM) |            |            |            |              |
|--------------|--------------------------------|------------|------------|------------|--------------|
|              | A2780                          | HCT116     | MCF-7      | A549       | Fibroblastos |
| <b>ACP19</b> | 0,6 ± 0,1                      | 1,0 ± 0,1  | 5,6 ± 0,1  | 29,8 ± 0,5 | 11,5 ± 0,1   |
| <b>HL1</b>   | 7,3 ± 0,1                      | NC         | NC         | NC         | NC           |
| <b>SA25</b>  | 0,5 ± 0,1                      | 0,9 ± 0,1  | 10,7 ± 0,6 | 14,5 ± 0,3 | 16,6 ± 0,2   |
| <b>HL2</b>   | NC                             | NC         | NC         | NC         | NC           |
| <b>SA22</b>  | 1,2 ± 0,2                      | 0,9 ± 0,1  | 5,9 ± 0,1  | 14,6 ± 0,4 | 11,8 ± 0,2   |
| <b>HL3</b>   | NC                             | NC         | NC         | NC         | NC           |
| <b>SA23</b>  | 3,7 ± 0,1                      | 11,0 ± 0,1 | 6,8 ± 0,5  | 48,5 ± 0,1 | NC           |
| <b>HL4</b>   | 17,3 ± 0,1                     | NC         | NC         | NC         | NC           |

O HL2 e HL3 não são citotóxicos nas quatro linhas celulares tumorais estudadas (Figuras 7.2-7.9 do Anexo A), enquanto que o HL1 apresenta um IC<sub>50</sub> relativo de 7,3 µM na linha celular A280 e o HL4 apresenta um IC<sub>50</sub> de 17,3 µM na mesma linha celular (Figura 7.1 e Figura 7.12 do Anexo A).

De entre os complexos avaliados, os complexos SA25 e ACP19 apresentaram o IC<sub>50</sub> relativo mais baixo nas linhas celulares A2780 e HCT116, o que indica uma maior atividade antiproliferativa (Figuras 4.1 e Figuras 7.1 e 7.4 do Anexo A). Apesar do complexo SA22 também apresentar um efeito citotóxico considerável, o estudo do seu mecanismo de ação biológico não foi continuado devido à pouca estabilidade deste complexo em solução.

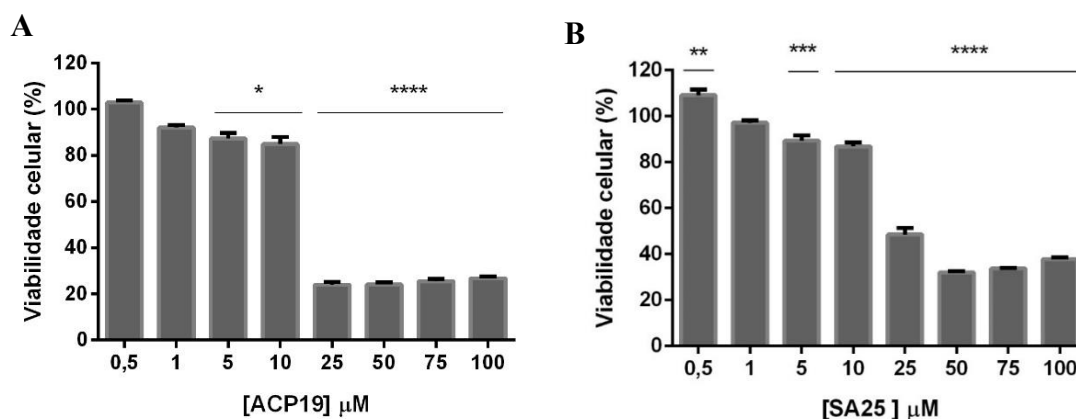
Os resultados dos complexos SA25 e SA22 e dos respectivos ligandos (Figural 7.2-7.9 do Anexo A), permitem concluir que, apesar de o ligando na forma livre não ser ativo nas linhas celulares estudadas, quando coordenado com o respetivo complexo de ruténio apresenta um efeito citotóxico, sendo um dos exemplos de ligandos tiossemicarbazona que apresenta atividade quando coordenada a um centro metálico. Em todos os casos estudados, a atividade do complexo é sempre superior à do ligando TSC: o ligando HL1 tem um efeito citotóxico considerável na linha celular A2780 e a coordenação do centro de {Ru(bpy)<sub>2</sub>}<sup>2+</sup> aumenta a sua atividade antiproliferativa. O mesmo acontece para o complexo SA23 (Tabela 4.1).



**Figura 4.1 – Viabilidade celular da linha tumoral A2788 após a exposição de 48 h ao complexo ACP19 (A) e ao complexo SA25 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao veículo de controle (células + 0,1% (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).

Como se pode constatar na Figura 4.1, o SA25 e ACP19 demonstram uma elevada capacidade de inibir a proliferação celular de células de carcinoma do ovário. No entanto, estes resultados têm pouco significado numa perspetiva de futura aplicação para a prática clínica se não tivermos em conta os efeitos dos complexos em células saudáveis, visto que uma atividade antiproliferativa elevada em células normais poderá induzir efeitos secundários indesejados. Desta forma, avaliou-se a toxicidade dos complexos na linha de fibroblastos de modo a estudar a sua seletividade para células tumorais.

Pela análise da Figura 4.2 e das Figuras 7.11 do Anexo A, observou-se uma diminuição gradual da viabilidade celular na presença dos complexos SA25, ACP19 e SA22. O complexo SA23 não mostrou qualquer efeito citotóxico na linha celular saudável (Figura 7.16 do Anexo A). Os compostos ACP19 e SA25 apresentam valores de  $IC_{50}$  na linha celular saudável de 11,5 e 16,6  $\mu M$  respetivamente. A partir destes resultados podemos afirmar que na concentração correspondente ao  $IC_{50}$  relativo em A2780, ambos os complexos não irão induzir citotoxicidade em células saudáveis.



**Figura 4.2 – Viabilidade celular da linha celular de fibroblastos após a exposição de 48 h ao complexo ACP19 (A) e ao complexo SA25 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao veículo de controle (células + 0,1% (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).

Foi realizado o cálculo do IS, de forma a observar a seletividade de um complexo numa determinada linha tumoral. Com a análise da Tabela 4.2 podemos afirmar que o complexo SA25 apresenta a maior seletividade citotóxica na linha tumoral A2780, sendo também seletivo para a linha HCT116. Todos os complexos são pouco seletivos para a linha A549 e (à exceção do SA23) para a linha MCF-7.

Os complexos ACP19 e SA25 mostraram um maior efeito antiproliferativo na linhagem celular A2780 (exibindo um  $IC_{50}$  de 0,6 e 0,5  $\mu$ M respetivamente) seguido da linhagem celular HCT116 ( $IC_{50}$  de 1,0 e 0,9  $\mu$ M) (Tabela 4.1 e Figura 7.1 e 7.4 Anexo A). Devido ao elevado efeito citotóxico na linha celular A2780, os restantes estudos biológicos foram prosseguidos nesta linha celular.

**Tabela 4.2 – Índices de seletividade (IS) dos complexos ACP19, SA25 e SA22 nas linhas tumorais estudadas.**

| Índice de seletividade |       |      |      |       |
|------------------------|-------|------|------|-------|
| Linha celular          | ACP19 | SA25 | SA22 | SA23  |
| <b>A2780</b>           | 19,1  | 33,2 | 9,8  | >27,1 |
| <b>HCT116</b>          | 11,5  | 18,4 | 13,1 | > 9,1 |
| <b>MCF-7</b>           | 2,1   | 1,6  | 2,0  | >14,7 |
| <b>A549</b>            | 0,4   | 1,2  | 0,8  | >2,1  |

De forma a comparar o potencial citotóxico dos complexos ACP19 e SA25 com agentes quimioterapêuticos utilizados na prática clínica, nomeadamente a cisplatina e a doxorrubicina, a sua atividade antiproliferativa foi igualmente avaliada na linha celular A2780 (Figura 7.18 do Anexo A). A cisplatina apresenta um  $IC_{50}$  relativo de 1,9  $\mu$ M, enquanto que a doxorrubicina apresenta um valor de 0,6  $\mu$ M para a linha celular A2780. Estes resultados demonstram que os complexos em estudo apresentam uma maior citotoxicidade em comparação com a cisplatina e uma citotoxicidade semelhante à da doxorrubicina. O SA25 e o ACP19 apresentam seletividade para células tumorais, e justificam assim o interesse na realização de estudos adicionais *in vitro* com vista à caracterização dos mecanismos subjacentes à sua ação antiproliferativa em A2780.

## 4.2. Avaliação do potencial Apoptótico

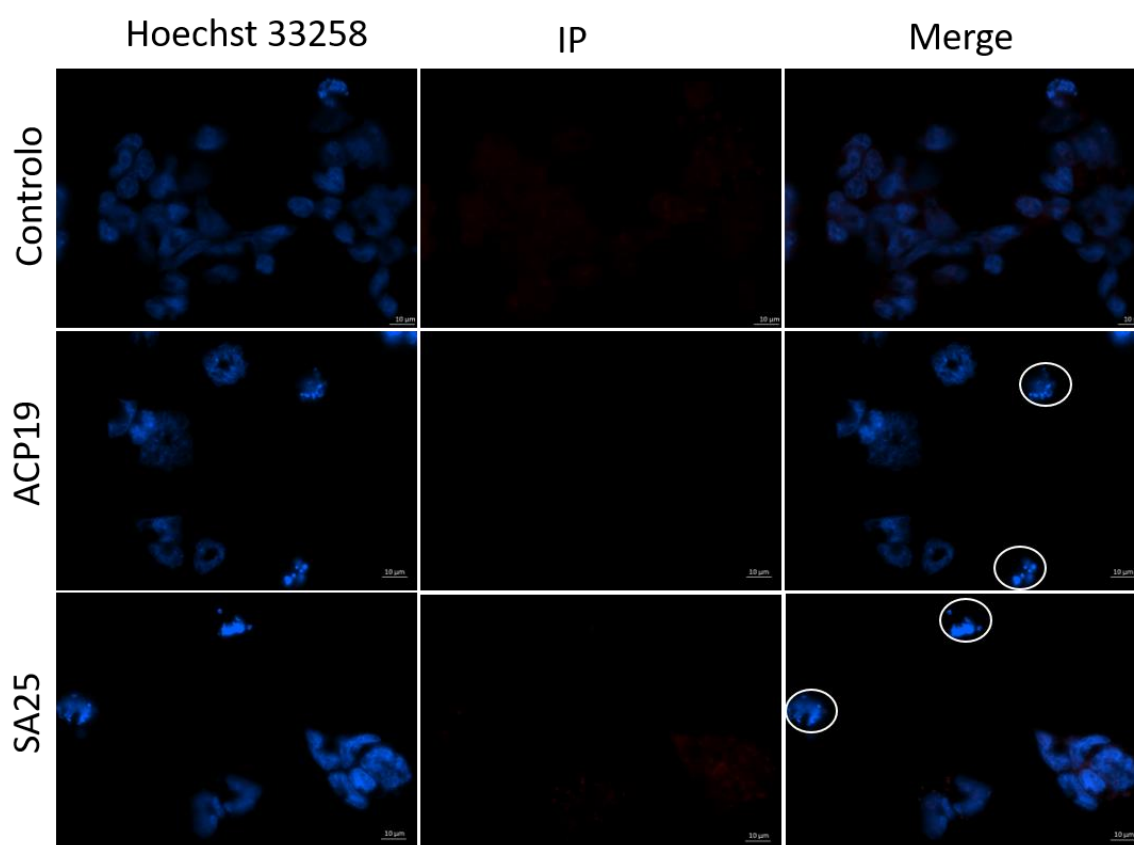
A apoptose constitui um processo de morte celular programada que permite eliminar as células sem causar danos às células adjacentes, e por isso, constitui um dos mecanismos ideais pelo qual os compostos podem induzir citotoxicidade em células tumorais (Elmore 2007). Muitos agentes quimioterapêuticos são capazes de induzir morte celular por apoptose, provocando danos no DNA ou em proteínas. Desta forma, a avaliação do processo de morte celular foi realizada através de dois métodos: i) marcação com Hoechst 33258 e iodeto de propídio (IP) e ii) marcação dupla com Anexina V-FITC e IP.

### 4.2.1. Marcação com a sonda Hoechst 33258 e IP

Uma análise preliminar à capacidade de os complexos em estudo induzirem apoptose foi realizada pela marcação com a sonda Hoechst 33258. Esta sonda tem uma elevada afinidade para ácidos nucleicos, permitindo a deteção de alterações nucleares, como condensação da cromatina, fragmentação nuclear e corpos apoptóticos (Silva, Sebastião, *et al.* 2014). Quando a sonda se encontra ligada ao DNA apresenta fluorescência azul, marcando as células morfológicamente normais e as células apoptóticas. As células viáveis apresentam uma fluorescência uniformemente distribuída, enquanto que as células apoptóticas apresentam fragmentação nuclear e condensação da cromatina, revelando uma intensidade de fluorescência maior (Cao *et al.* 2011). Por outro lado, o IP apenas cora o núcleo das células quando a

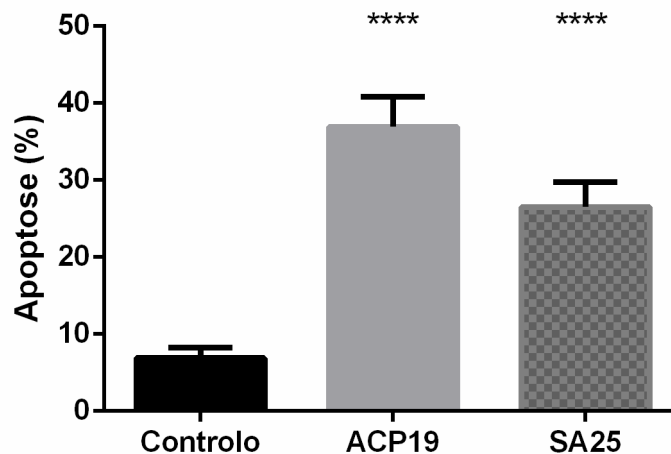
integridade ou a permeabilidade da membrana está comprometida, podendo dar uma indicação de apoptose tardia mas geralmente associado a processos de necrose (Brumatti *et al.* 2008).

O potencial apoptótico dos complexos ACP19 e SA25 foi avaliado pela marcação com a sonda Hoechst 33258 na linha tumoral A2780, exposta à concentração do IC<sub>50</sub> dos complexos (Figura 4.3). As células nas mesmas condições experimentais foram igualmente marcadas com IP para percepção do comprometimento da permeabilidade das membranas celulares. As células controlo (na presença de 0,1% (v/v) de DMSO) apresentam núcleos com fluorescência uniformemente distribuída, bem como células em mitose (Figura 4.4). Por outro lado, na presença dos complexos, observa-se uma fragmentação nuclear e a condensação da cromatina. Além disso, observa-se uma redução do número de células em relação ao controlo, confirmando o efeito citotóxico destes complexos. Porém, não se observam nas imagens qualquer marcação com IP e, visto que este corante apenas cora o núcleo das células que tenham perdido a integridade da membrana, isso indica que os complexos em estudo não induzem necrose em A2780.



**Figura 4.3 – Células da linha tumoral A2780 marcadas com a sonda Hoechst (fluorescência de excitação e de emissão de 352 e 461nm, respetivamente) para a visualização de núcleos apoptóticos.** As células cresceram em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal de bovino na presença de 0,1% (v/v) DMSO (veículo, controlo) ou na presença do IC<sub>50</sub> dos complexos ACP19 e SA25 por 48h. Os círculos representam fragmentação nuclear. Estes resultados resultam de três ensaios independentes onde foram analisadas pelo menos 15 imagens para cada condição em estudo, sendo posteriormente as imagens analisadas pelo software *ZEISS Microscope Software ZEN*.

A percentagem de células apoptóticas, em que se observam alterações morfológicas, tais como condensação da cromatina e fragmentação nuclear foi contabilizada tendo o complexo ACP19 exibido ( $37 \pm 4$ ) % de células apoptóticas (um aumento de 5,2 vezes em relação ao controlo), enquanto que o complexo SA25 exibiu ( $27 \pm 3$ ) % de células apoptóticas (um aumento de 3,8 vezes em relação ao controlo) (Figura 4.4).



**Figura 4.4 – Percentagem de células com alterações morfológicas na linhagem celular A2780 após exposição ao IC<sub>50</sub> dos complexos.** Apenas as células com núcleos apoptóticos foram consideradas na quantificação/contagem. Os dados estão representados como média  $\pm$  SEM e a significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (controlo) pelo método *one-way ANOVA* seguido de um teste *Tukey* de comparação múltipla (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).

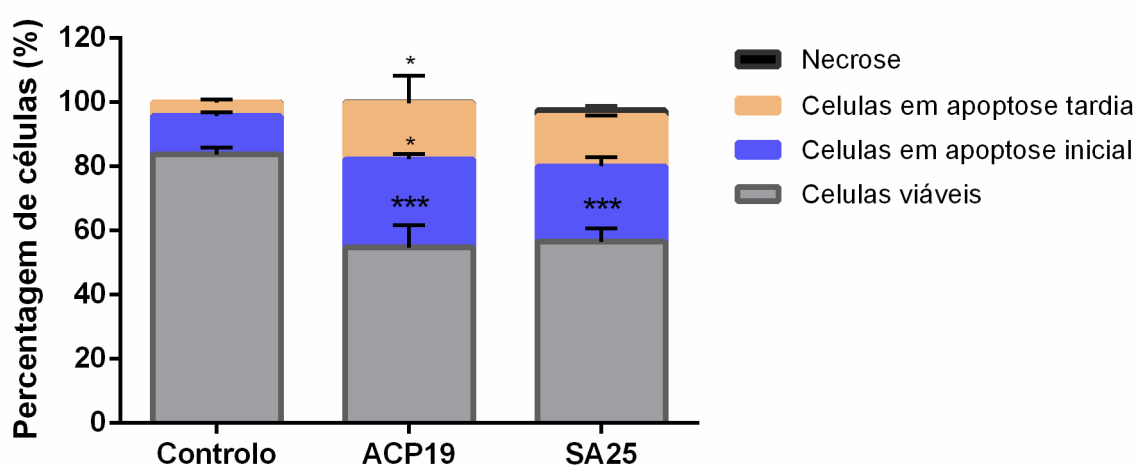
Estes resultados demonstraram a capacidade de os complexos induzirem alterações morfológicas nas células tumorais características da apoptose. No entanto, a quantificação de células em apoptose não foi fácil dado que a morfologia do núcleo das células A2780 é irregular. Assim, de forma a quantificar com mais precisão a indução de apoptose nas células tumorais, procedeu-se à análise por citometria de fluxo em células de carcinoma colorectal (HCT116) após dupla marcação com Anexina V-FITC e IP e (*vide* procedimento experimental).

#### 4.2.2. Marcação com Anexina V-FITC e IP.

De forma a confirmar os resultados obtidos pela marcação com Hoechst 33285 com maior especificidade e sensibilidade, realizou-se a marcação com Anexina V-FITC e IP em células da linhagem tumoral HCT116 (linha celular para a qual os complexos em estudo também são ativos e apresentam um IS elevado), e sua análise posterior por citometria de fluxo, uma técnica com maior especificidade e sensibilidade que o ensaio anterior.

A Anexina V pertence a uma família de proteínas, que compartilham estruturas e funções semelhantes, que se ligam aos fosfolípidos de uma forma reversível e dependente da concentração de  $Ca^{2+}$  (Brumatti *et al.* 2008). A Anexina V liga-se eficientemente à fosfatidilserina, quando esta se encontra no folheto externo da membrana celular (Brumatti *et al.* 2008). A externalização da fosfatidilserina é um evento inicial da apoptose e ocorre antes da perda da integridade da membrana celular, sendo uma das características da morte celular programada (Backorová *et al.* 2012; Brumatti *et al.* 2008). O FITC (isotiocianato de fluoresceína) é um fluoróforo que se conjuga com a Anexina V de forma a detetar as células apoptóticas (Brumatti *et al.* 2008; Cao *et al.* 2011). O IP é um fluoróforo que penetra nas células apenas quando a membrana celular está comprometida e emite fluorescência vermelha quando se intercala com o DNA, marcando células em apoptose tardia e células necróticas (Brumatti *et al.* 2008; Brun *et al.* 2012). A citometria de fluxo empregando a dupla marcação com Anexina-FITC e IP permite a discriminação entre células viáveis ( $FITC^-/IP^-$ ), células que se encontram numa fase inicial da apoptose ( $FITC^+/IP^-$ ), células apoptóticas em estados tardios ( $FITC^+/IP^+$ ) e células em necrose ( $FITC^-/IP^+$ ) (Brun *et al.* 2012; Silva *et al.* 2013).

Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.6 e na Tabela 4.2. Nas células controlo (0,1% DMSO) verifica-se que a maioria das células (83,7 %) se encontram sem qualquer marcação (FITC<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>), correspondendo às células viáveis. No caso das células incubadas na presença dos complexos (ao seu IC<sub>50</sub>) observa-se uma diminuição de quase 55% das células viáveis para o ACP19 e de 57% para o SA25 (Figura 4.5, Tabela 4.3). Em relação aos outros tipos de marcação, podemos observar que a maiorias das células apoptóticas se encontram numa fase inicial e, portanto, com marcação (FITC<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>), ou seja, o numero de células em apoptose inicial aumentou nos compostos em relação ao controlo, registando-se 12,1 % no DMSO, 27,5 % no ACP19 e 23,5 % no SA25 (Figura 4.5, Tabela 4.3). Verificou-se também um aumento do numero de células em apoptose tardia na presença dos complexos, passando de 4,2 % no controlo para 17,5 % no ACP19 e 15,8% no SA25. Em relação às células necróticas, observa-se um aumento não significativo entre o controlo e as células expostas aos complexos, de 0,02% no controlo, 0,2% no ACP19 e 1,7% no SA25 (Figura 4.5, Tabela 4.3).



**Figura 4.5 – Quantificação das células HCT116 em apoptose por de citometria de fluxo com a marcação dupla com Anexina-FITC e IP.** As células HCT116 foram expostas ao IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>(ACP19) = 1,0 µM; IC<sub>50</sub>(SA25) = 0,9 µM) dos complexos e a 0,1% de (v/v) DMSO (veículo, controlo) por 48 h. Os dados estão representados como média ± SEM. A significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (controlo) pelo método *one-way ANOVA* seguido de um teste *Tukey* de comparação múltipla (\* p ≤ 0.05, \*\*\* p ≤ 0.001).

**Tabela 4.3 – Percentagem de células viáveis, células em apoptose inicial e tardia e células necróticas após a incubação de células HCT116 com 0,1% (v/v) de DMSO (controlo) ou com os respectivos IC<sub>50</sub> dos complexos.** Os valores são referentes aos dados apresentados na Figura 4.6, com a respetiva média e SEM.

|                                    | Controlo    | ACP19      | SA25       |
|------------------------------------|-------------|------------|------------|
| <b>Células Viáveis</b>             | 83,7 ± 2,1  | 54,7 ± 7,1 | 56,5 ± 4,2 |
| <b>Células em apoptose inicial</b> | 12,1 ± 1,2  | 27,5 ± 1,7 | 23,5 ± 2,9 |
| <b>Células em apoptose tardia</b>  | 4,2 ± 0,9   | 17,5 ± 8,7 | 15,8 ± 0,2 |
| <b>Células necróticas</b>          | 0,02 ± 0,03 | 0,2 ± 0,07 | 1,7 ± 1,4  |

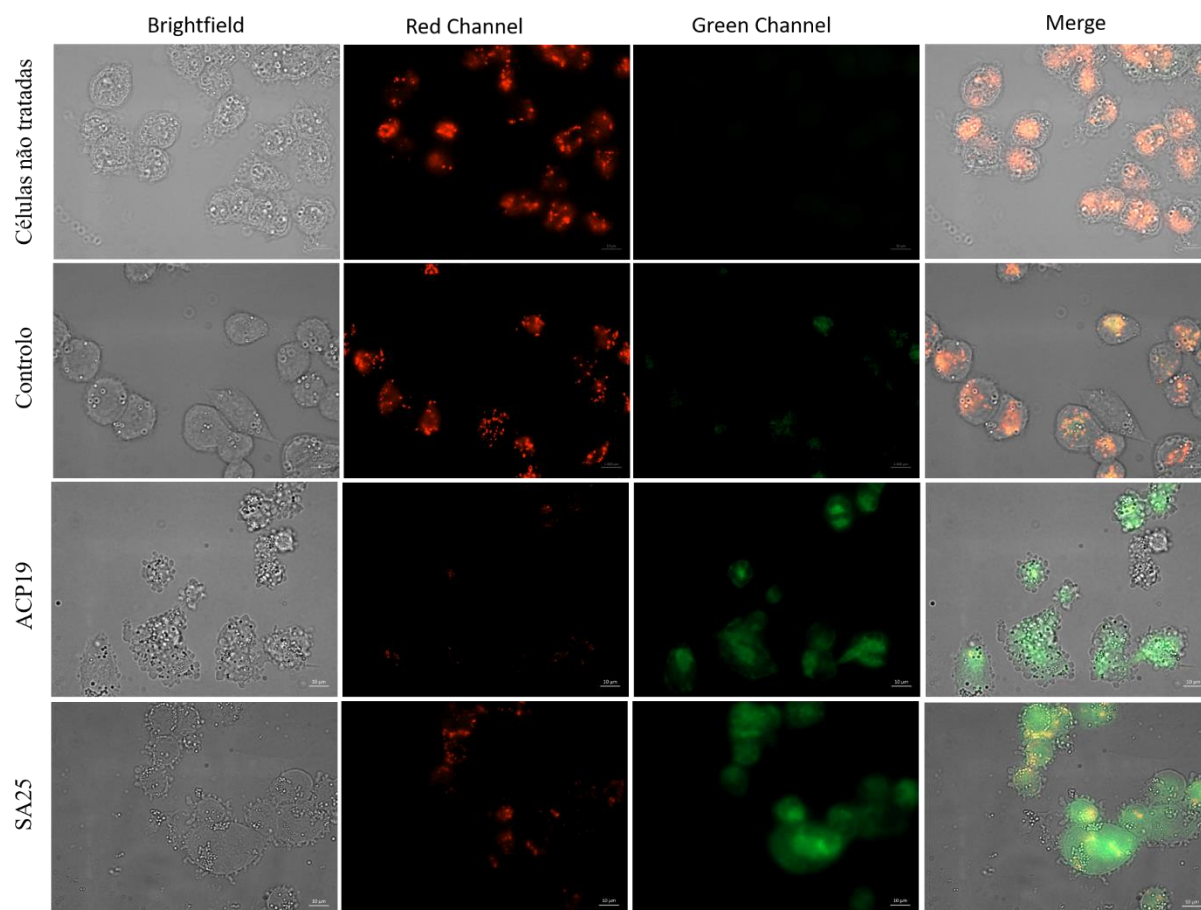
Com estes resultados confirma-se que os compostos promovem a indução do processo apoptótico na linhagem HCT116, tal como inicialmente observado com a marcação com Hoechst 33258 em A2780.

#### 4.2.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_M$ )

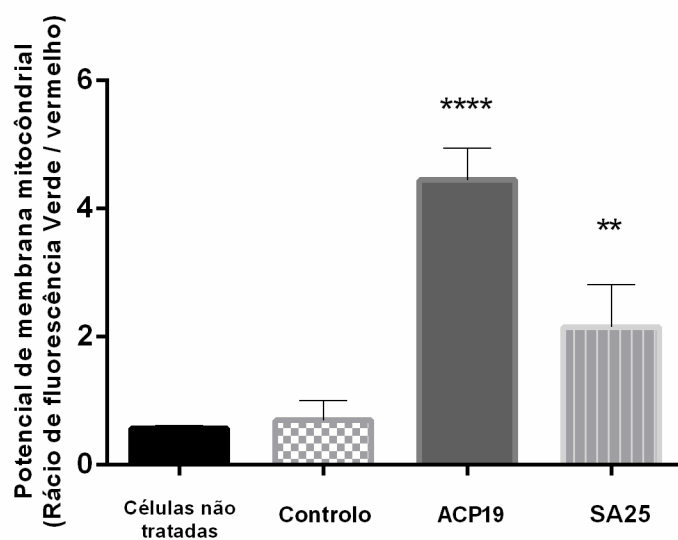
A permeabilização da membrana mitocondrial é um dos eventos iniciais que ocorre após a indução da apoptose por via mitocondrial. Nesse sentido, torna-se importante avaliar o potencial da membrana mitocondrial de forma a confirmar os resultados obtidos na marcação dupla com Anexina-FITC e IP (Castedo *et al.* 2002; Jia *et al.* 2014). Para a avaliação do  $\Delta\Psi_M$  das células tratadas com e sem complexos, utilizou-se o corante JC-1. O JC-1 sofre mudanças reversíveis na emissão de fluorescência, de verde para vermelho, com o aumento do  $\Delta\Psi_M$ . As células saudáveis com alto  $\Delta\Psi_M$  irão formar agregados JC-1 e emitir fluorescência vermelha, devido ao potencial negativo dentro da membrana mitocondrial. Por outro lado, em células apoptóticas com baixo  $\Delta\Psi_M$ , o JC-1 mantém-se na forma monomérica, emitindo fluorescência verde (Perelman *et al.* 2012; Castedo *et al.* 2002).

Pela análise da Figura 4.6 verifica-se que a maioria das células não tratadas exibe uma intensa fluorescência vermelha (agregados JC-1) e uma fraca fluorescência verde (monómeros JC-1), indicando que estas células são saudáveis. Estes resultados são similares às células expostas ao DMSO (veículo, controlo). Por outro lado, a exposição das células A2780 aos complexos (na concentração correspondente ao seu respetivo  $IC_{50}$ ) mostrou uma perda da fluorescência vermelha e um aumento de intensidade da fluorescência verde no citoplasma.

As alterações do rácio de fluorescência verde/vermelho refletem alterações no potencial de membrana (Figura 4.7). As células não tratadas apresentam um rácio de  $0,5 \pm 0,04$  e o DMSO um rácio de  $0,7 \pm 0,3$ , o que confirma o estado saudável das células (Figura 4.7). No entanto, quando expostas aos complexos, o rácio aumenta para  $2,15 \pm 0,2$ , confirmando os resultados de imagem por microscopia de fluorescência (Figura 4.6). Estes resultados sugerem que os compostos induzem disrupção da membrana mitocondrial.



**Figura 4.6 – Imagens da microscopia de fluorescência do efeito dos complexos no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_M$ ) na linha celular A2780.** As células foram incubadas na presença do  $IC_{50}$  dos complexos ou com 0,1% (v/v) DMSO (veículo, controle), por 48h. Estes resultados resultam de três ensaios independentes onde foram analisadas pelo menos 15 imagens para cada condição em estudo, sendo as imagens posteriormente analisadas pelo software *ZEISS Microscope Software ZEN*.



**Figura 4.7 – Rácio de fluorescência verde/vermelho do potencial de membrana mitocondrial.** As células A2780 foram incubadas na presença de  $IC_{50}$  dos complexos ou com 0,1% (v/v) DMSO (veículo, controle), por 48h. Os dados estão representados como média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (DMSO, veículo) pelo método *one-way ANOVA* seguido de um teste *Tukey* de comparação múltipla (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).



Estes resultados sugerem o envolvimento da via intrínseca da apoptose no mecanismo de ação destes compostos.

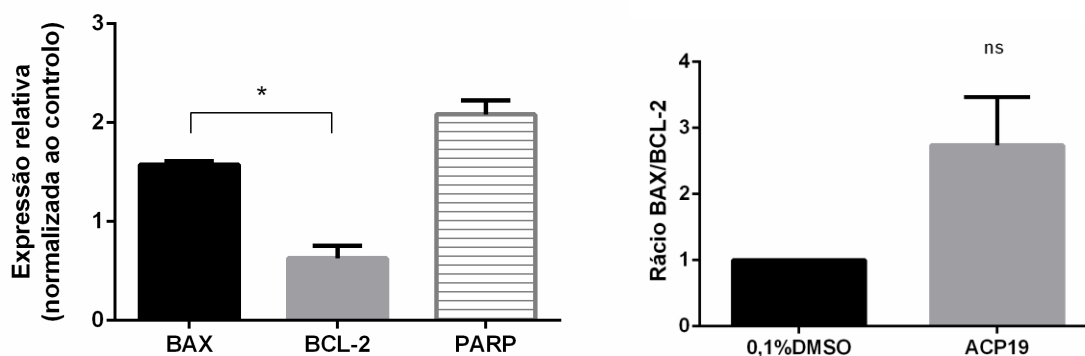
A perda do potencial de membrana mitocondrial provoca a translocação da proteína pró-apoptótica BAX para a mitocôndria, e provoca a libertação do citocromo c para o citosol. Assim, os membros da família BCL-2 desempenham um papel importante na regulação da apoptose, visto que a sobre-expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 impede a libertação do citocromo C, enquanto que a sobre-expressão da BAX facilita a libertação do citocromo C após a despolarização da membrana mitocondrial (Malik *et al.* 2007). De modo a confirmar estes resultados, analisaram-se os níveis de expressão das proteínas BCL-2 e BAX por *western blot* e a indução de ROS por microscopia de fluorescência.

#### 4.2.4. Análise dos níveis das proteínas pró- e anti-apoptóticas por *Western Blot*

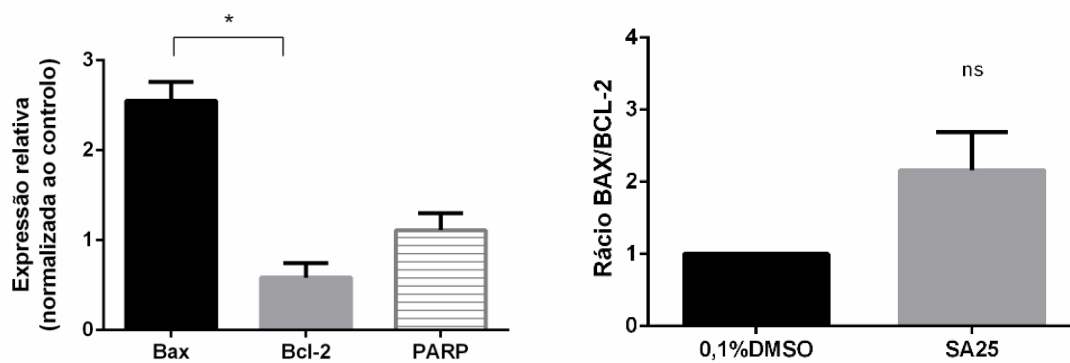
A via intrínseca de morte celular é regulada pelas proteínas da família BCL-2, constituída por reguladores pro-apoptóticos e anti-apoptóticos que, comprometendo ou não a integridade da mitocôndria, permitem a ativação ou a inibição da libertação do citocromo c, respetivamente, e que na primeira situação origina a ativação da caspase 3 e a clivagem proteolítica PARP, Poli (ADP-Ribose) Polimerase (Qian *et al.* 2013; Katiyar *et al.* 2005; Lima *et al.* 2014).

A proteína BAX é uma proteína pro-apoptótica e um aumento da sua expressão está associado com a indução da apoptose, enquanto que o aumento de expressão da proteína BCL-2 está associada com mecanismo de sobrevivência celular (Katiyar *et al.* 2005).

A análise das Figuras 4.8 e 4.9 permite observar um aumento da expressão de BAX após a exposição das células aos complexos, e uma diminuição da expressão da BCL-2. Um rácio BAX/BCL-2 elevado é uma característica da via intrínseca da apoptose (Elmore 2007). Observando a Figura 4.8 e 4.9 verifica-se um aumento do rácio BAX/BCL-2 (fator de indução da apoptose). Em relação à proteína PARP, a exposição das células A2780 a ambos os complexos induz um aumento de expressão das proteínas PARP (Figura 4.8 e 4.9).



**Figura 4.8 – A) Níveis de expressão de BAX, BCL-2 e PARP em células A2780 pelo complexo ACP19 (no seu IC<sub>50</sub>). B). Rácio BAX/BCL-2. Dados relativizados face ao controlo (0,1% (v/v) DMSO) após normalização em relação ao western blot da  $\beta$ -actina. Os dados estão representados como média  $\pm$  SEM de dois ensaios independentes e a significância estatística foi avaliada pelo método *one-way ANOVA* seguido de um teste *Tukey* de comparação múltipla: a) grupo de referência (BCL-2); b) grupo de referência (DMSO, veículo) (\*  $p \leq 0.05$ , ns – estatisticamente não significativo).**

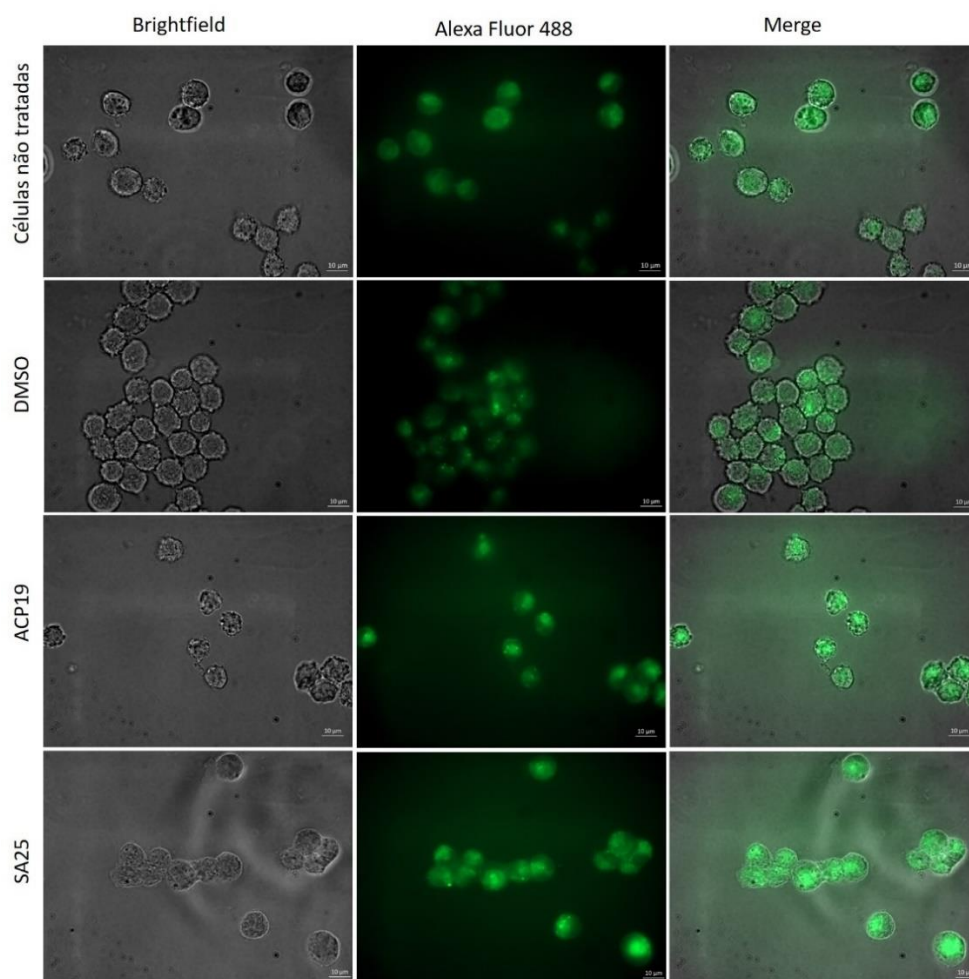


**Figura 4.9 – A) Níveis de expressão de BAX, BCL-2 e PARP em células A2780 pelo complexo SA25 (no seu IC<sub>50</sub>). B). Rácio BAX/BCL-2.** Os resultados apresentados são a média de dois ensaios independentes. Dados relativizados face ao controlo (0,1% (v/v) DMSO) após normalização em relação ao *western blot* da  $\beta$ -actina. Os dados estão representados como média  $\pm$  SEM de dois ensaios independentes e a significância estatística foi avaliada pelo *one-way ANOVA* seguido de um teste *Tukey* de comparação múltipla: a) grupo de referência (BCL-2); b) grupo de referência (DMSO, veículo) (\*  $p \leq 0.05$ , ns – estatisticamente não significativo).

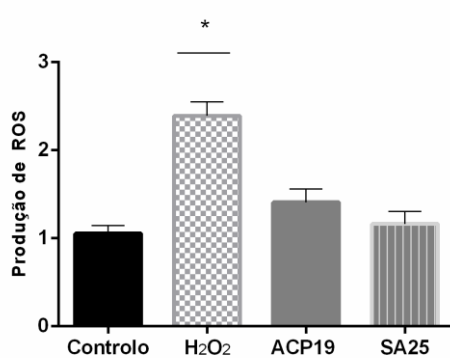
Com base nestes resultados, o aumento da expressão da proteína BAX pode desencadear a despolarização do potencial da membrana mitocondrial, como evidenciado pelo ensaio JC-1, e consequentemente induzir a apoptose, suportando que o mecanismo de morte celular induzida por estes complexos será apoptose por via intrínseca.

#### 4.2.5. Detecção da produção intracelular das espécies reativas de oxigénio

A acumulação de ROS intracelular é essencial para o efeito inibidor de crescimento. Vários investigadores reportaram o efeito citotóxico de um composto via o ROS (Malik *et al.* 2007). De forma a observar se o mecanismo de ação dos complexos era dependente da produção de ROS, realizou-se um ensaio de fluorescência no qual se utilizou o H<sub>2</sub>DCF-DA como sonda fluorescente. O H<sub>2</sub>DCFDA é clivado pela esterase intracelular para uma forma não fluorescente (DCFH) que na presença de espécies reativas de oxigénio é oxidada, dando origem à diclorofluoresceína (DCF) (fluorescente) (Li *et al.* 2014). Foi utilizado como controlo positivo o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Na Figura 4.10 observa-se que a exposição dos complexos na linha celular A2780 não provoca alterações na intensidade de fluorescência em relação ao controlo. Os resultados, quantificados na figura 4.11, sugerem que ambos os complexos não induzem a formação de ROS.



**Figura 4.10 – Identificação da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por microscopia de fluorescência.** As células da linha celular A2780 foram incubadas com o IC<sub>50</sub> do complexo ou com 0,1% (v/v) DMSO (veículo, controle) por 48h. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado como controle positivo. Estes resultados resultam de três ensaios independentes onde foram analisadas pelo menos 15 imagens para cada condição em estudo, sendo posteriormente as imagens analisadas pelo software ZEISS *Microscope Software ZEN*.



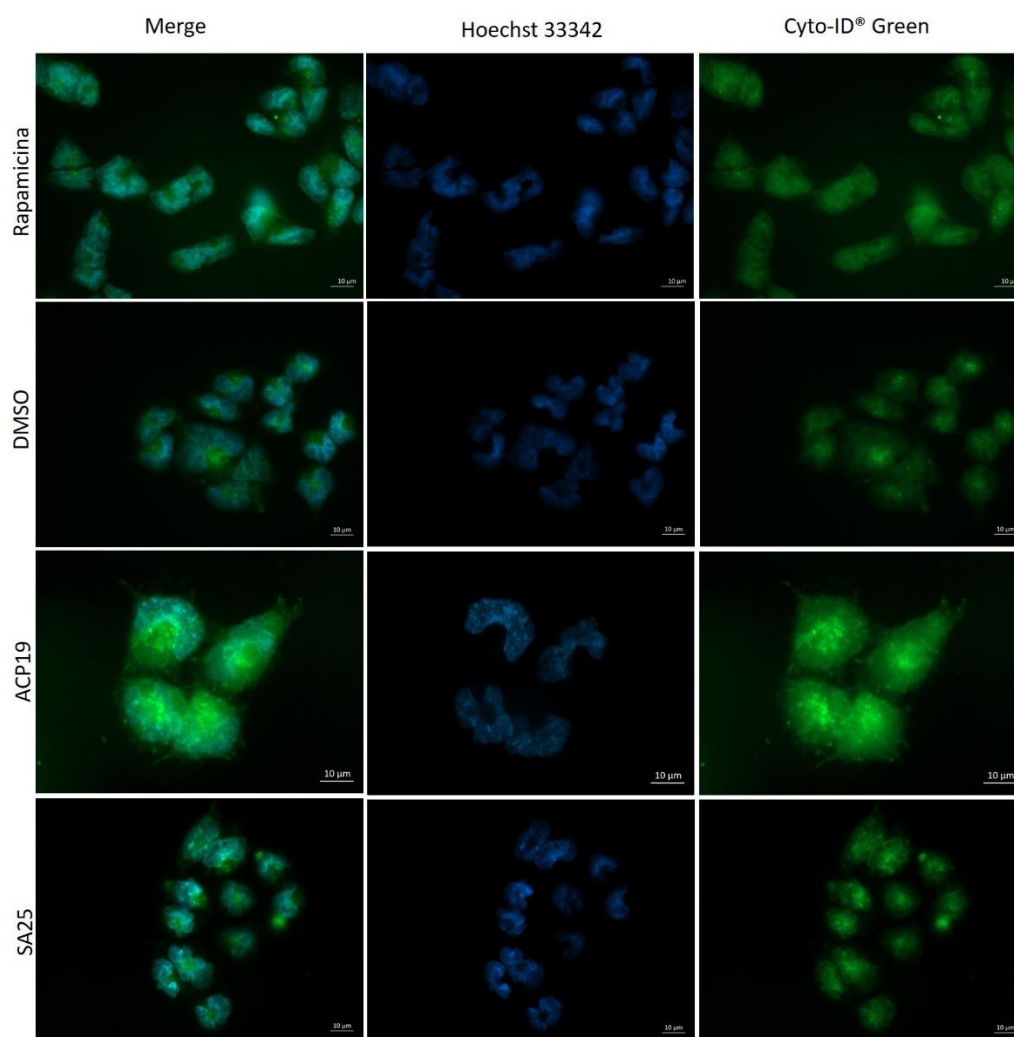
**Figura 4.11 – Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS): quantificação da intensidade de fluorescência do corante H<sub>2</sub>DCF-DA na linha celular A2780.** As células foram incubadas na presença de IC<sub>50</sub> dos complexos ou com 0,1% (v/v) DMSO (veículo, controle), por 48h. Os dados estão representados como média ± SEM e foram normalizados em relação às células não tratadas. A significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (DMSO) pelo método *one-way ANOVA* seguido de um teste *Tukey* de comparação múltipla (\*  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.6. Avaliação do efeito dos compostos na morte celular autofágica

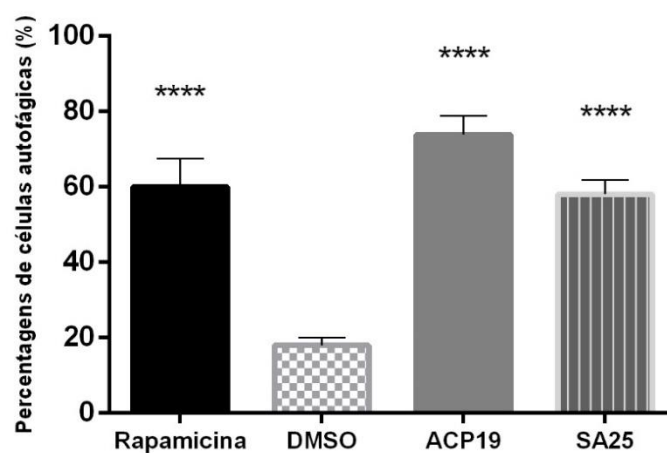
A autofagia é um processo que as células usam para digerir componentes internos de forma a recuperar nutriente (Wagner *et al.* 2017). No cancro este processo pode ter dois papeis: atuar como supressor de tumor, o que previne a iniciação da tumorigénese, ou pode ajudar as células cancerígenas a resistir a condições de stress, promovendo o crescimento de novas células tumorais (Pettersen *et al.* 2016)

A avaliação da morte celular autofágica nas células A2780 foi analisada após a exposição das células A2780 aos complexos (ao IC<sub>50</sub>) ou a 0,1% (v/v) de DMSO durante 48 h, por microscopia de fluorescência. Utilizou-se o kit *Cyto-ID® Autophagy detection*, que contém dois fluoróforos: o Hoechst 33342 ( $\lambda_{exc} = 353$  nm;  $\lambda_{em} = 461$  nm, que marca ácidos nucleicos e permite identificar condensação da cromatina e fragmentação nuclear) e o *Cyto-ID® Green*, ( $\lambda_{exc} = 488$  nm;  $\lambda_{em} = 530$  nm, que torna fluorescente as vesículas que são produzidas durante o processo autofágico) (Li *et al.* 2009; Science 2017). A rapamicina, um antibiótico lipofílico, foi utilizada como controlo positivo. Observando a Figura 4.12, verifica-se que as células expostas à rapamicina e aos complexos mostram uma acumulação do *Cyto-ID® Green* no citoplasma.

A quantificação da percentagem de células autofágicas foi realizada pela contagem de células que continham autofagolisossomas. As células tratadas com o complexo ACP19 apresentavam 74% de células autofágicas, enquanto que as tratadas com o complexo SA25 apresentam cerca de 50% de autofagia, um aumento bastante considerável em relação ao controlo (17%) (Figura 4.13). Comparando estes resultados com os obtidos para a rapamicina, constata-se que ambos os complexos apresentam um efeito idêntico ao indutor-controlo da autofagia, sugerindo que os complexos ACP19 e SA25 induzem igualmente morte celular autofágica na linha tumoral A2780 (Figura 4.13).



**Figura 4.12 – Imagens da microscopia de fluorescência com dupla marcação com Hoechst 33342 e Cyto-ID® Green.** As células A2780 foram incubadas com o IC50 do complexo ou com 0,1% (v/v) DMSO (veículo, controle), por 48h. Nas imagens observa-se características do mecanismo autofágico, como os autofagossomas. Estes resultados resultam de três ensaios independentes onde foram analisadas pelo menos 15 imagens para cada condição em estudo, sendo posteriormente as imagens analisadas pelo software ZEISS Microscope Software ZEN. A Rapamicina foi utilizada como controle positivo.



**Figura 4.13 – Percentagem de células com autofagossomas.** As células A2780 foram incubadas na presença de IC50 dos complexos, com 0,1% (v/v) DMSO (veículo, controle) ou com Rapamicina, por 48h. Os dados estão representados como média  $\pm$  SEM. A significância estatística foi avaliada em relação ao grupo de referência (DMSO) pelo método *one-way ANOVA* seguido de um teste *Tukey* de comparação múltipla (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).

Com base nestes resultados, pode concluir-se que ambos os complexos sugerem induzir um mecanismo de morte celular através da via mitocondrial e através da morte celular autofágica.

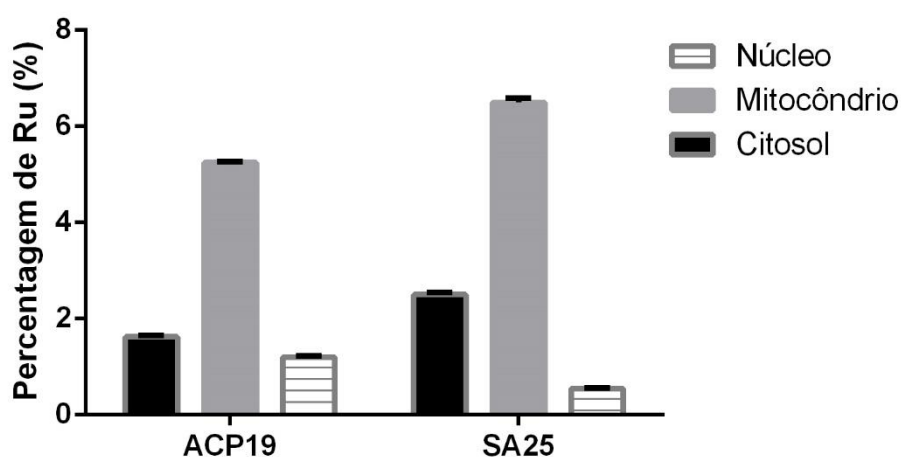
A apoptose e a autofagia estão sob o controlo de múltiplos sinais comuns. O *cross-talk* entre autofagia e a apoptose é um processo muito complexo. Algumas condições adversas provocam autofagia e apoptose dentro da mesma célula, principalmente numa sequência em que a autofagia precede a apoptose. Isto acontece porque, na maioria dos casos, o stress estimula a resposta autofágica, especialmente se o dano não for letal (Bisceglie *et al.* 2016). No entanto, a autofagia mostrou exercer funções duplas e díspares nos tumores humanos, ou seja, atua tanto como supressor de tumor ou como promotor de tumor (Fulda & Kögel 2015). Isto é, apesar da noção de que a indução da autofagia em resposta a tratamentos anticancerígenos muitas vezes representa um mecanismo citoprotector das células tentando lidar com o stress, há atualmente evidências da existência de morte celular por autofagia (Gozuacik & Kimchi 2007). O envolvimento da morte celular autofágica pode oferecer novas opções para superar a resistência ao tratamento, e tem sido relatada a sua utilização como um mecanismo de *backup* nesse contexto (Fulda & Kögel 2015).

#### 4.3. Localização subcelular

O conhecimento da distribuição do composto dentro da célula é fundamental em *drug delivery*, onde o objetivo principal é maximizar a interação do composto com o seu alvo. (Duvvuri *et al.* 2004).

A distribuição intracelular dos compostos na linha tumoral A2780 foi estudada utilizando o *Cell Fractionation Kit-Standard*. Esta kit permite separar as frações citosólicas, mitocondriais e nucleares, através do uso de detergentes que aproveitam as características e a composição das diferentes membranas celulares.

A Figura 4.14 mostra a distribuição dos complexos ACP19 e SA25 entre a fração citosólica, mitocondrial e nuclear, sendo que a maior acumulação dos complexos se encontra na fração mitocondrial. Ambos os complexos se acumulam 2,5 x mais na mitocôndria que no citosol. Estes resultados sugerem que os complexos têm como alvo principal a mitocôndria, resultado este em concordância com o aumento do potencial mitocondrial atrás observado (Figura 4.7).



**Figura 4.14 – Distribuição subcelular dos complexos ACP19 e SA25 na linha celular A2780.** As células foram incubadas na presença de 40  $\mu$ M dos complexos por 6h. Os dados estão representados como média  $\pm$  SEM de dois ensaios independentes.

#### 4.4. Progressão do ciclo celular

A avaliação do ciclo celular foi realizada de forma a compreender melhor os mecanismos moleculares subjacentes à atividade citostática destes complexos, pela avaliação dos seus efeitos na progressão do ciclo celular. A inibição da proliferação nas células cancerígenas expostas aos complexos pode ser resultado da indução da apoptose e/ou da paragem do ciclo celular. De facto, quando as células cancerígenas são retidas na fase S, a mitose e a proliferação celular são inibidas (Luo *et al.* 2012).

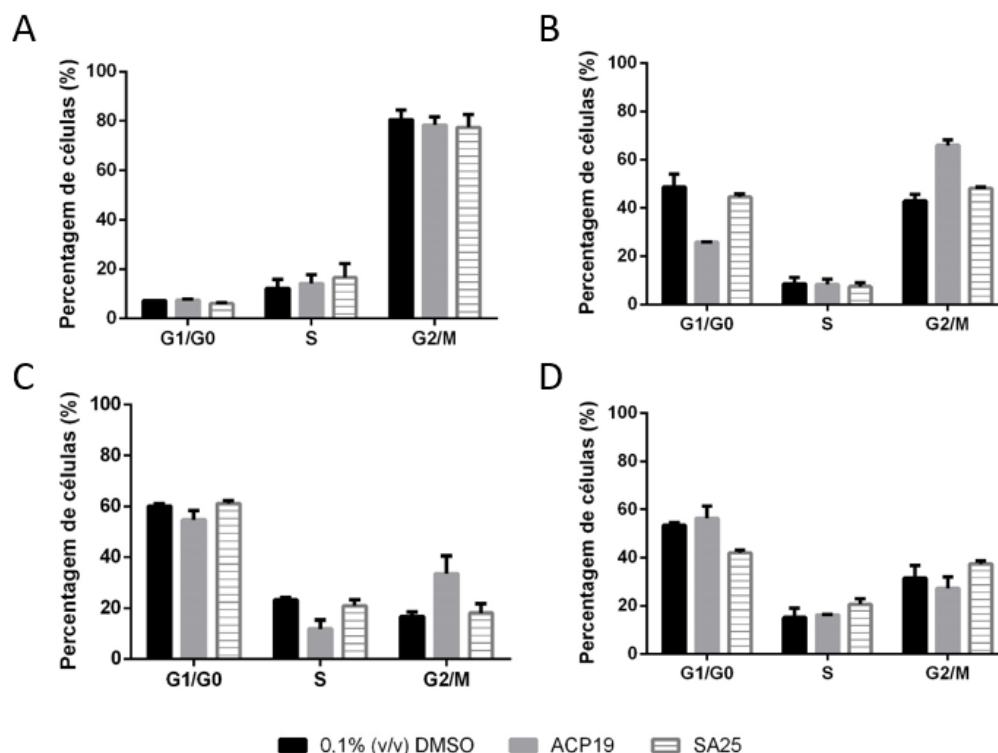
A análise do ciclo celular foi realizada através da quantificação do conteúdo de DNA usando a sonda fluorescente IP, onde as células foram sujeitas a um duplo bloqueio com timidina, que sincroniza as células na fase S. Posteriormente as células foram incubadas com os complexos e com o controlo, de forma a observar diferenças entre os mesmos, ou seja, se a paragem do ciclo celular é devida à exposição dos complexos. Neste ensaio, foram utilizadas as células HCT116 devido às dificuldades de procedimento com as células A2780. Deste modo, foram realizados ensaios de citometria de fluxo em células da linha HCT116, após a incubação com os complexos a 4,9,12 e 24h. Os resultados estão apresentados na Figura 4.15 e na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4 – Fração de células HCT116 (em %), na fase G1/G0, S e G2/M, quando exposta ao IC<sub>50</sub> do complexo e a 0,1% (v/v) de DMSO (veículo, controlo).** As células foram previamente submetidas a um duplo bloqueio com timidina e analisadas por citometria de fluxo após marcação com IP. Os dados estão representados como Média  $\pm$  SEM de dois ensaios independentes.

|              | 4h             |                |                | 9h             |                |                |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|              | Controlo       | ACP19          | SA25           | Controlo       | ACP19          | SA25           |
| <b>G1/G0</b> | 7,2 $\pm$ 0,1  | 7,5 $\pm$ 0,4  | 6,0 $\pm$ 0,4  | 48,6 $\pm$ 5,4 | 25,8 $\pm$ 0,1 | 44,5 $\pm$ 1,1 |
| <b>S</b>     | 12,2 $\pm$ 3,9 | 14,2 $\pm$ 3,5 | 16,6 $\pm$ 5,7 | 8,5 $\pm$ 2,7  | 8,3 $\pm$ 2,3  | 7,4 $\pm$ 1,7  |
| <b>G2/M</b>  | 80,6 $\pm$ 3,9 | 78,5 $\pm$ 3,2 | 77,4 $\pm$ 5,3 | 42,9 $\pm$ 2,7 | 65,9 $\pm$ 2,2 | 48,1 $\pm$ 0,5 |

|              | 12h            |                |                | 24h            |                |                |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|              | Controlo       | ACP19          | SA25           | Controlo       | ACP19          | SA25           |
| <b>G1/G0</b> | 60,1 $\pm$ 0,9 | 54,7 $\pm$ 3,8 | 61,1 $\pm$ 1,2 | 53,3 $\pm$ 1,3 | 56,4 $\pm$ 4,9 | 42,1 $\pm$ 1,1 |
| <b>S</b>     | 23,2 $\pm$ 0,9 | 11,9 $\pm$ 3,4 | 20,8 $\pm$ 2,4 | 15,2 $\pm$ 3,9 | 16,3 $\pm$ 0,2 | 20,6 $\pm$ 2,3 |
| <b>G2/M</b>  | 16,7 $\pm$ 1,9 | 33,5 $\pm$ 7,1 | 18,1 $\pm$ 3,6 | 31,5 $\pm$ 5,2 | 27,3 $\pm$ 4,8 | 37,4 $\pm$ 1,3 |



**Figura 4.15 – Efeito dos complexos e do DMSO (veículo, controlo) na progressão do ciclo celular em HCT116.** As células foram sincronizadas e expostas ao IC<sub>50</sub> dos complexos e a 0,1% (v/v) de DMSO, por 4h (A), 9h (B), 12h (C) e 24 h (D) e analisadas por citometria de fluxo após marcação com IP. Os dados estão representados como média ± SEM de dois ensaios independentes.

Observando o que ocorre em células-controlo incubadas apenas com o veículo (0,1% (v/v) DMSO) verifica-se que com 4 horas de incubação a maioria das células se encontra na fase G2/M (80%) (Figura 4.15). Após 9 h observa-se uma progressão no ciclo celular e as células encontram-se maioritariamente na fase G1/G0 (48%). Às 12h o número de células em G1/G0 aumenta para 61% e aumenta a percentagem de células em fase S e após 24 h a percentagem de células em mitose continua a aumentar, confirmando a progressão do ciclo celular (Figura 4.15).

Em relação às células incubadas com o SA25 não se verificou atraso nem paragem na progressão do ciclo celular, apresentando um comportamento semelhante ao controlo.

Nas células expostas ao ACP19 durante 4 h, 78% das células encontram-se na fase G2/M, observando que não existe diferenças em relação ao controlo. No entanto, passado 9h de incubação com o ACP19 observa-se um atraso na progressão do ciclo celular comparativamente ao controlo, apresentando 26% das células em G1/G0 e 66% em G2/M. Contudo, passado 12 h observa-se um aumento das células em G1/G0 (55%), com uma diminuição em G2/M. Comparando com as células-controlo das 12 h, observam-se diferenças ainda na fase G2/M. Com estes resultados podemos verificar que o complexo ACP19 parece induzir um ligeiro atraso na progressão do ciclo celular em G2/M.

Um passo crucial na regulação da entrada das células eucariotas na mitose é a ativação da proteína cinase Cdc2 pela proteína fosfatase Cdc25C (Peng *et al.* 1997). Em resposta ao dano no DNA, a Cdc25C pode ser fosforilada pelas cinases dos pontos de controlo, sendo translocado do núcleo para o citoplasma, contribuindo para a perda de incapacidade de desfosforilar o Cdc2 levando ao atraso das células em G2 devido à incapacidade de ativar o Cdc2 (Zhang *et al.* 2011).



## 4.5. Estudos de interação com o DNA

A ligação de pequenas moléculas com o DNA tem sido amplamente estudada, dado o seu papel no controlo da estrutura e funcionamento das células (Liu *et al.* 2010; Chaires 2006). Numerosas experiências biológicas demonstraram que o DNA é o principal alvo intracelular dos compostos anticancerígenos. A interação das moléculas com o DNA pode causar dano nas células cancerosas, bloquear a sua divisão e levar à morte celular (Putta *et al.* 2015).

Visto que nos ensaios de localização subcelular uma pequena percentagem dos complexos chegava ao núcleo, é importante perceber se essa quantidade que chega ao núcleo é suficiente para que o DNA seja um alvo celular importante para a sua ação.

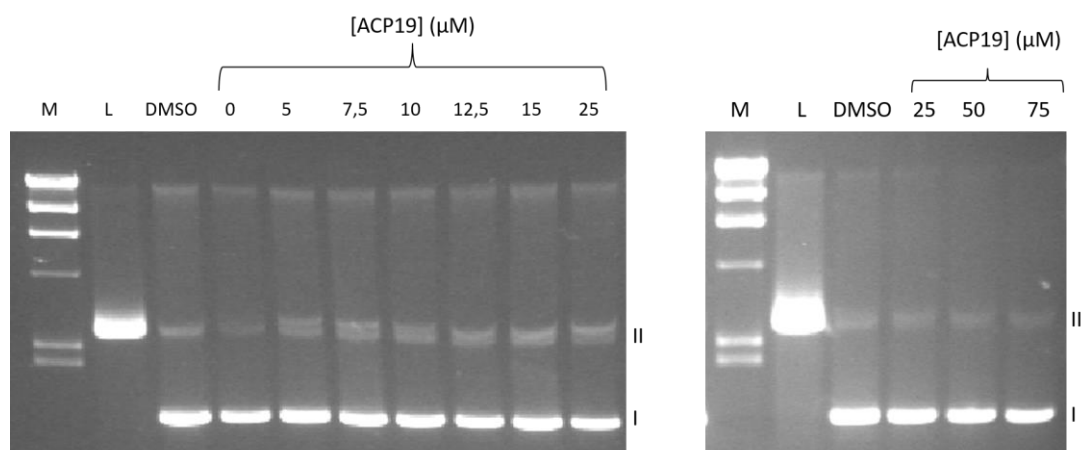
A existência e magnitude da interação dos complexos com o DNA pode ser avaliada em estudos *in vitro*, nomeadamente por titulações UV-Vis, mobilidade electroforética através do estudo da clivagem do DNA e dicroísmos circular. Estes ensaios, que poderão revelar a existência de interação entre complexos e o DNA, apresentam-se nas subsecções seguintes.

### 4.5.1. Estudos de clivagem do DNA

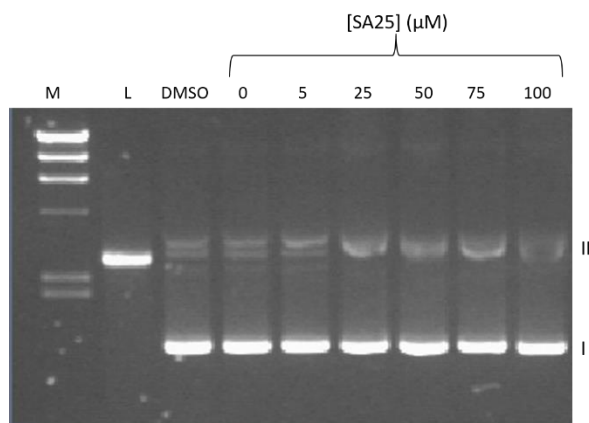
Os mecanismos de interação dos compostos de iões metálicos com as cadeias duplas do DNA incluem intercalação, interação com os sulcos do DNA e ligação electrostática externa. Os agentes intercalantes podem causar o desenrolamento das hélices duplas como resultado do seu posicionamento entre as bases do DNA, e provocar um retardamento na sua migração em gel de agarose (Palchaudhuri & Hergenrother 2007; Silva *et al.* 2014). Pelo contrário, os complexos que estabelecem uma interação com o sulcos do DNA, não conseguem desencadear mudanças conformacionais no DNA como os agentes intercalantes, uma vez que os complexos ajustam a sua estrutura ao sulco menor e seguem a torção da molécula ao longo do eixo central (Chaires 2006).

A reação de clivagem do DNA plasmídico pode ser monitorizada por eletroforese em gel de agarose. O DNA plasmídico, apresenta-se numa conformação circular compacta conhecida como a forma superenrolada (forma I). Sob agressões químicas a forma superenrolada pode ser clivada, sendo o resultado final distinto se a clivagem ocorre na cadeia simples ou na cadeia dupla (Anitha *et al.* 2013; Silva *et al.* 2014). Assumindo que a forma superenrolada é clivada em cadeia simples, o DNA adquire uma conformação relaxada, a forma circular (Forma II), que pode ser convertida em uma forma linear (Forma III) após a clivagem da cadeia complementar perto do primeiro local de clivagem. Por outro lado, a forma superenrolada pode ser convertida na forma linear através da clivagem em cadeia dupla (Liu *et al.* 2010). Consoante a natureza da interação dos complexos com o DNA plasmídico, e de acordo com a conformação obtida por essa molécula, são observadas diferentes taxas de migração quando são submetidas ao gel de eletroforese (Putta *et al.* 2015).

A avaliação da interação entre os complexos e o DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose utilizando o DNA plasmídico (pUC18). A incubação dos complexos com o pUC18 foi realizada por um período de 6h, com concentrações crescentes de complexo. Através da análise detalhada das Figuras 4.16 e 4.17 que reúnem estes resultados pode observar-se que os complexos não efetuam a clivagem na molécula de DNA nem alteraram a sua mobilidade em gel. A ausência destes efeitos é evidente mesmo na maior concentração de complexo testada



**Figura 4.16 – Efeito do complexo ACP19 no DNA plasmídico pUC18: resultados obtidos com 0,05 % de DMSO (veículo, controle) e diferentes concentrações de ACP19 (0 a 75 µM).** A incubação decorreu durante 6h a 37°C em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,2, sendo os produtos dessa reação sujeitos a análise por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v), 2h a 80V. Os resultados são de três ensaios independentes A) M -  $\lambda$ /HindIII (marcador de pesos moleculares; L– pUC18 linearizado; 0 a 75 – concentração crescente de complexo; D- DMSO, I – forma superenrolada, II. forma circular.



**Figura 4.17 – Efeito do complexo SA25 no DNA plasmídico pUC18: resultados obtidos com 0,05 % de DMSO (veículo, controle) e diferentes concentrações de SA25 (0 a 100 µM).** A incubação decorreu durante 6h a 37°C em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,2, sendo, posteriormente, os seus produtos sujeitos a eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v), 2h a 80V. Os resultados são de três ensaios independentes A) M -  $\lambda$ /HindIII (marcador de pesos moleculares; L– pUC18 linearizado; 0 a 75 – concentração crescente de complexo; D- DMSO, I – forma superenrolada, II. Forma circular

Estes resultados sugerem que o mecanismo subjacente da atividade antiproliferativa não está relacionada com a clivagem do pDNA nem com mecanismos de intercalação no DNA.

Estes resultados estão em concordância com o ensaio de ROS, onde os complexos não induziram a formação de ROS (Figura 4.11), visto que o aumento das espécies reativas pode induzir à clivagem do DNA (Kim *et al.* 2016).

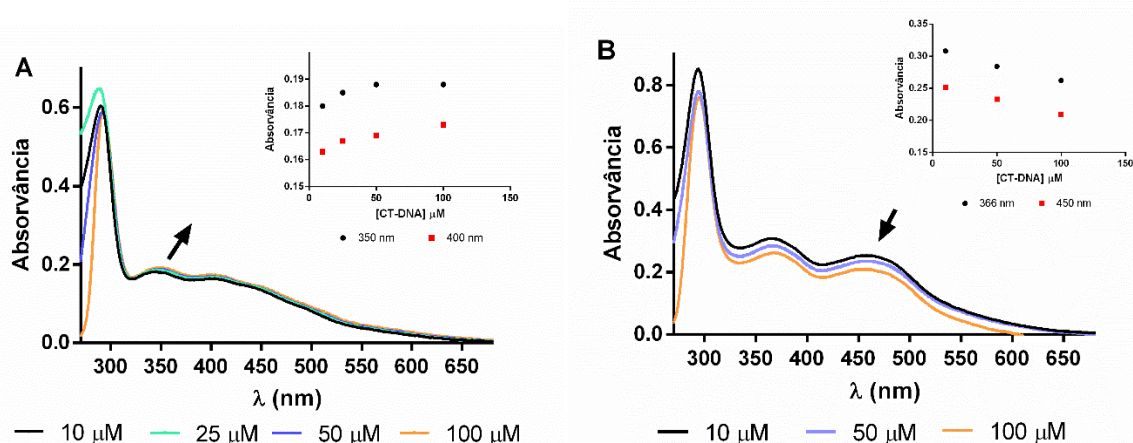
#### 4.5.2. Espectroscopia de absorção UV-Vis

Os agentes anticancerígenos interagem com o DNA de diferentes formas, nomeadamente intercalação entre as pares de base do DNA, ligação aos sulcos do DNA, ligação covalente/*cross-linking*, clivagem do DNA e incorporação dos nucleósidos análogos. A interação que ocorre entre o DNA e o composto resulta na formação de um complexo, que altera a estabilidade termodinâmica e as propriedades funcionais do DNA. A compreensão de como a complexação afeta a estrutura e as propriedades mecânicas do DNA são um passo crucial na elucidação dos mecanismos funcionais da ligação dos

agentes, podendo fornecer informações no *design* de novos fármacos (Sirajuddin *et al.* 2013; Reddy *et al.* 2014).

Os compostos de rutênio têm atraído uma grande atenção devido à interação com a molécula de DNA através de interações não covalentes, como ligações electrostáticas, ligações aos sulcos e intercalação. Entre estes tipos de ligação, a intercalação e a ligação aos sulcos do DNA, são dependentes da dupla hélice do DNA (Kalanur *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010).

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica eficaz que permite examinar o modo de ligação do DNA aos complexos de iões metálicos. Uma alteração sistemática nos espectros de absorção do composto na presença de concentrações crescentes de CT-DNA reflete a existência de uma possível interação entre os dois e essas alterações podem ser usadas para quantificar a interação (Anitha *et al.* 2013; Sirajuddin *et al.* 2013). O modo de ligação intercalativa tem sido caracterizado por um grande desvio em bandas do espectro UV-Vis para maiores comprimento de onda, enquanto que a ligação aos sulcos do DNA se traduz por um desvio menor para o vermelho (Kalanur *et al.* 2009). Procedeu-se ao estudo da interação dos complexos com o CT-DNA para determinar os possíveis modos de ligação e calcular as constantes de ligação ao DNA ( $K_b$ ), de forma a determinar a intensidade de ligação do complexo para posterior comparação. O espectro UV-Vis foi traçado usando uma concentração constante de complexo com a presença de concentrações crescentes de CT-DNA. O espectro eletrónico do ACP19 apresenta três bandas características, a 290 nm, 340 nm e a 404 nm, enquanto que o SA25 apresenta uma banda a 290 nm, um a 365 nm e outro a 450 nm. Na região do UV, a banda de absorção intensa observada por estes espectros (a 290 nm) corresponde as transições  $\pi - \pi^*$  intraligando dos ligandos bpy coordenados. Na região do visível, as bandas de menor intensidade são atribuídas à transição de transferência de carga metal-ligando (MLCT) (Putta *et al.* 2015; Liu *et al.* 2010). Foi escolhido a banda a 340 nm no caso do ACP19 e a banda a 450 nm no caso do SA25 de forma a estimar a constante de estabilidade envolvida no processo de interação dos complexos com o DNA.

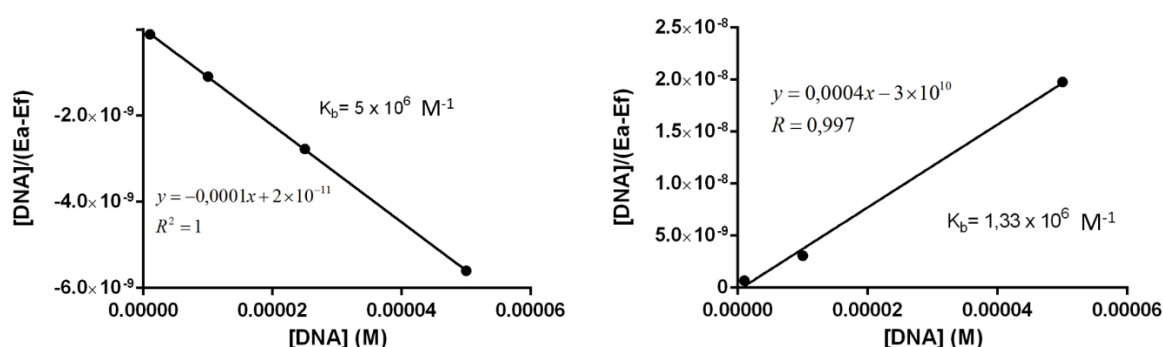


**Figura 4.18 – Variação da absorvância do complexo AC19 (A) e SA25 (B) (25 μM) na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (10 a 100 μM).** A seta indica a variação da absorvância com o aumento da concentração de CT-DNA e a maior concentração está representada a vermelho. As soluções foram incubadas durante 6 horas a 37°C no tampão de 5mM de Tris-HCL e 50 mM NaCl, pH 7,02. Os resultados são de dois ensaios independentes. *Insets:* a) Absorvância a 350 e 400 nm de soluções de ACP19 (25 μM) e concentrações crescentes de CT-DNA; b) Absorvância a 366 e 450 nm do SA25 (25 μM) na presença de concentrações crescentes de CT-DNA.

Como se pode observar na Figura 4.18 o espectro do complexo ACP19, apresenta um efeito hipercrômico (aumento da absorvância com o aumento de concentração) e um desvio batocrômico de 340 nm para 348 nm. Estes resultados revelam uma forte interação entre o complexo e o DNA. O modo de ligação intercalativa tem sido caracterizado como uma mudança para maiores comprimento de onda

( $\geq 15$  nm), enquanto que a ligação aos sulcos do DNA se traduz por um deslocamento menor para o vermelho ( $\leq 8$  nm) (Kalanur *et al.* 2009). O desvio dos picos de absorção a 340 nm é de  $\sim 8$  nm estes resultados são compatíveis com um mecanismo em que a interação do complexo com a molécula de DNA pode dar-se através da interação com o sulco do DNA.

Em relação ao complexo SA25, apresenta um efeito hipocrómico (diminuição da absorvância) e a presença de um desvio batocrómico. A presença conjunta de hipocromismo e batocromismo está normalmente associada a um modo de interação por intercalação (Shahabadi *et al.* 2011). No entanto, o efeito hipocrómico pode ser indicativo de uma interação com os sulcos do DNA (Silva, Sebastião, *et al.* 2014). Com base nos ensaios realizados anteriormente, verificou-se que a interação do pDNA com o SA25 não efetuou a clivagem da molécula de DNA e nem alterou a sua mobilidade em gel com o aumento da concentração do complexo (Figura 4.18). Se o composto SA25 exibisse um mecanismo de intercalação com o DNA, iria resultar no desemparelhamento da dupla hélice do DNA; com consequente redução da migração da electroforética da forma superenrolada (Luís *et al.* 2014). Visto isto, os efeitos observados podem ser indicativos da ligação do complexo ao sulco do DNA.



**Figura 4.19 – Representação de Benesi-Hildebran para o cálculo de das constantes de afinidade dos complexos ACP19 (A) e SA25 (B) para com o DNA ( $K_b$ ).** Os valores experimentais foram retirados dos espectros UV-vis das soluções de trabalho (com uma concentração fixa de 25  $\mu$ M de complexo e concentração variável de CT-DNA (10 a 100  $\mu$ M) no tampão de 5mM de Tris-HCL e 50 mM NaCl, pH 7,02, usando a absorvância medida a 350 nm no ACP19 e a 450 nm no SA25. Os resultados são de dois ensaios independentes.

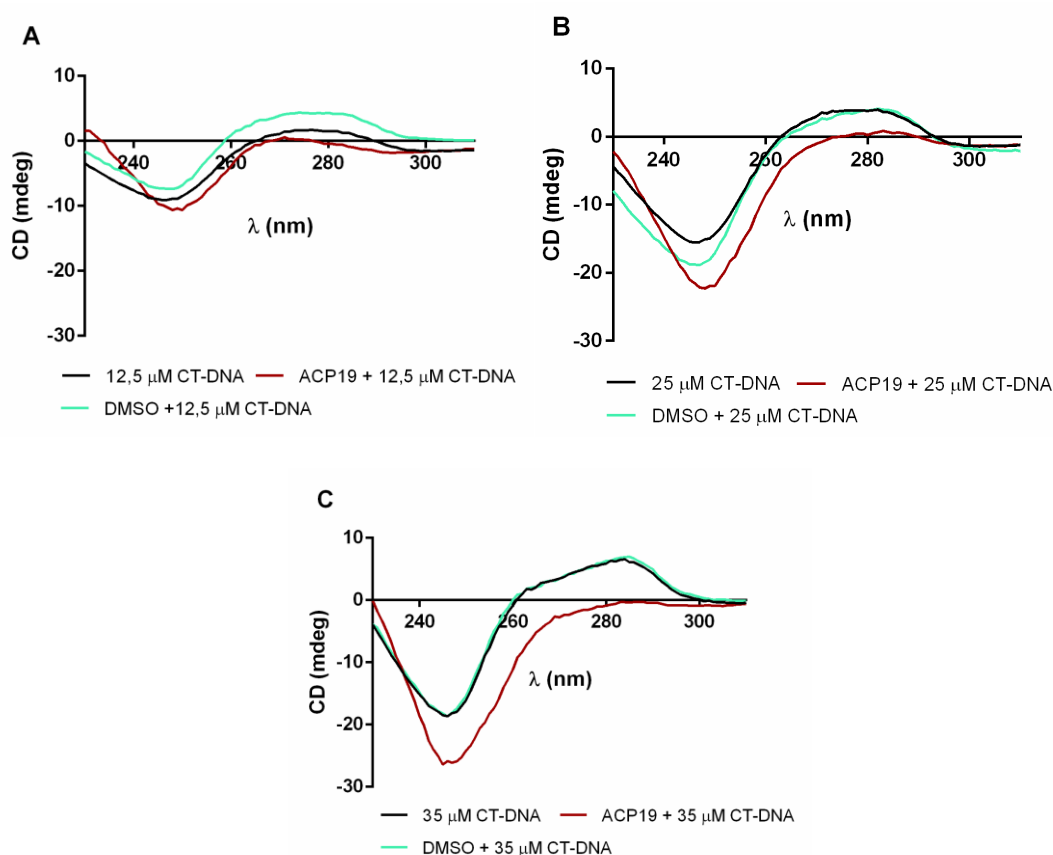
O cálculo da constante de afinidade para o DNA ( $K_b$ ) permitiu quantificar a intensidade de ligação dos complexos. O valor  $K_b$  obtido para o complexo ACP19 ( $K_b \pm \text{SEM}$ ) foi de  $(5 \pm 0,05) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  e para o SA25 foi de  $(1,33 \pm 0,02) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Quando comparados com o valor de  $K_b$  para a doxorrubicina [ $(3,48 \pm 0,03) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ], observa-se que as constantes dos complexos se encontram numa ordem de grandeza superior, o que indica que estes complexos têm uma capacidade de ligação ao DNA maior do que a doxorrubicina (Luís *et al.* 2014).

### 4.5.3. Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica sensível e muito útil para monitorizar mudanças conformacionais no polímero de DNA induzidas pela interação de um composto, bem como a estabilidade da hélice do DNA (Shahabadi *et al.* 2011). O espectro de CD da conformação B do DNA apresenta dois sinais característicos: uma banda negativa a 246 nm, que reflete a helicidade do DNA, e uma banda positiva a 278 nm devido ao empilhamento das bases do DNA (Lenis-Rojas *et al.* 2017; Shahabadi *et al.* 2011). As mudanças no espectro de CD do DNA (pela modificação ou pela intensidade das bandas) na presença de uma pequena molécula é uma evidência da interação muito próxima entre esta e o DNA. As alterações no sinal de CD do DNA observado pela intercalação com compostos, pode ser atribuída às alterações da estrutura do DNA. Assim uma ligação simples no sulco de pequenas

moléculas mostra pouca perturbação na helicidade das bandas, enquanto que a intercalação aumenta a intensidade de ambas as bandas estabilizando a conformação  $\beta$  direita do DNA, como se observa para o intercalador azul metileno (Rajesh *et al.* 2012; Shahabadi *et al.* 2013).

Neste ensaio só se realizou para o complexo ACP19, devido ao elevado custo que a técnica apresenta. Portanto, de forma a observar as mudanças conformacionais através do espectro CD, o ACP19 e o DMSO (controlo) foram incubados com concentrações crescentes de CT-DNA. Como se pode observar na Figura 4.20 as alterações espectrais de CD induzidas pelo composto revelam pouca perturbação no empilhamento de bases e na helicidade do DNA. A banda positiva a 278 nm mostra um deslocamento para o vermelho não significativo com uma diminuição da intensidade após a adição do composto. Enquanto, que na banda negativa a 242 verifica-se um aumento da intensidade da banda. Além disso, não é observado nenhum sinal de CD induzido. Este fenómeno pode ser devido à ligação aos sulcos que destabiliza a forma  $\beta$  direita do DNA e indica que o DNA é desenrolado após a interação com este composto (Shahabadi *et al.* 2013).



**Figura 4.20 – Espectro CD da interação do ACP19 com CT-DNA em tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl, pH 7,0 com incubação de 6h a 37°C.** A) Espectro CD do CT-DNA (12,5  $\mu$ M), do complexo (25  $\mu$ M) e de 1% (v/v) de DMSO (veículo, controlo), na presença de 12,5  $\mu$ M CT-DNA. B) Espectro CD do CT-DNA (25  $\mu$ M), do complexo (25  $\mu$ M) e de 1% (v/v) de DMSO (veículo, controlo), na presença de 25  $\mu$ M CT-DNA. C) Espectro CD do CT-DNA (35  $\mu$ M), do complexo (25  $\mu$ M) e de 1% (v/v) de DMSO (veículo, controlo), na presença de 35  $\mu$ M CT-DNA). Os resultados são de dois ensaios independentes-

Estes resultados demonstram uma interação dos complexos com a molécula de DNA (ligação aos sulcos) *in vitro*. Em conclusão, apesar de se observar uma forte interação dos complexos com o DNA, não há indicações que este poderá ser um dos alvos principais destes complexos, visto que nos ensaios da localização subcelular apenas uma fração muito pequena dos complexos chega ao núcleo (Figura 4.15). No entanto, a análise do ciclo celular para o complexo ACP19 permite observar um ligeiro atraso na progressão do ciclo que pode ser correlacionado com este efeito (Figura 4.16).



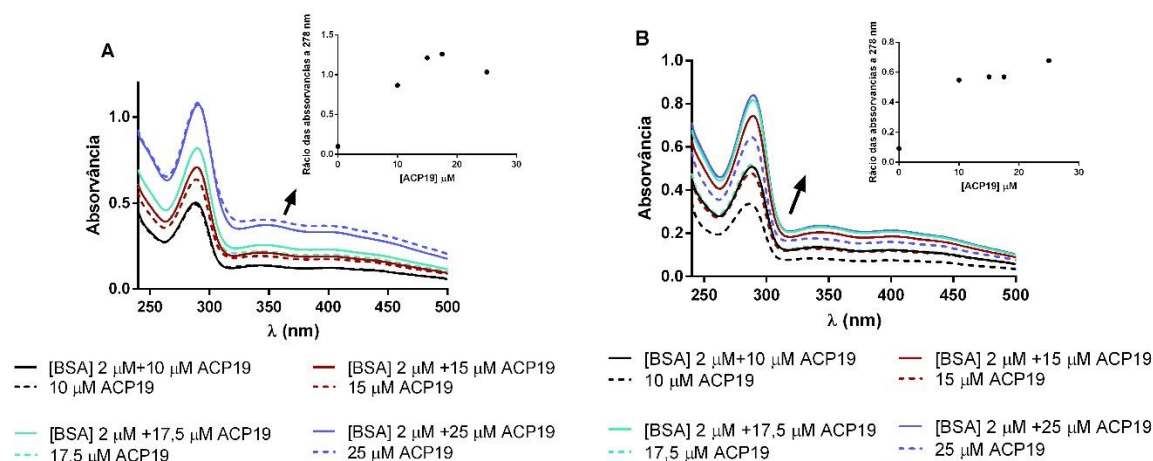
#### 4.6. Interação com a BSA e HSA

A interação entre os compostos e bio-macromoléculas séricas atraiu grande interesse nas últimas décadas. A interação com as proteínas do plasma é um parâmetro exigido pela FDA (Food and Drug Administration, USA) na proposta de novos agentes terapêuticos, sendo reconhecido como um passo crucial no acesso à biodisponibilidade dos complexos de íons metálicos (Luís *et al.* 2014; Demoro *et al.* 2013; Pessoa & Tomaz 2010). Estas proteínas têm como função principal o transporte não específico no sistema circulatório de muitos compostos, alterando também a farmacocinética, a biodisponibilidade e a distribuição dos fármacos. A sua ligação pode aumentar a solubilidade e prolongar o tempo de semivida *in vivo* dos compostos, com uma libertação do fármaco no alvo específico (Li *et al.* 2011; Topala *et al.* 2014; Pessoa & Tomaz 2010).

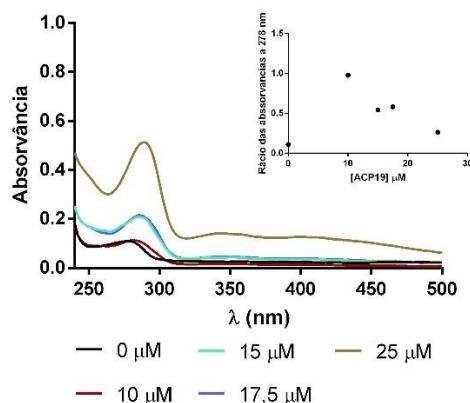
A albumina do soro, é a principal proteína do plasma sanguíneo, atuando como transportador e distribuidor de muitos fármacos devido à sua capacidade de se ligar reversivelmente a uma variedade de compostos exógenos (Tian *et al.* 2015; Li *et al.* 2011).

A BSA (albumina do soro bovino) é uma proteína globular que tem sido estudada extensivamente, devido à sua homologia estrutural com a albumina do soro humano (HSA) (Hu *et al.* 2006). As estruturas primárias da BSA e da HSA apresentam 75% da mesma sequência de aminoácidos, sendo o teor de histidina em ambas as proteínas o mesmo. No entanto, a HSA contém um maior teor de valina e apenas um único resíduo de triptofano, enquanto que a BSA apresenta dois resíduos Trp (Pessoa & Tomaz 2010; Efthimiadou *et al.* 2010).

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica muito utilizada para estudar as interações entre as proteínas e complexos (Xu *et al.* 2013). O espectro de absorção UV-Vis da BSA inclui duas bandas características, uma a 220 nm e outra a 280 nm, devido à estrutura hélice  $\alpha$  da proteína e dos resíduos aminoácidos, respetivamente (Topala *et al.* 2014; Xu *et al.* 2013). Normalmente, uma diminuição do pico de absorvância a 220 nm corresponde a uma perturbação da estrutura secundária da proteína, enquanto que uma alteração na banda a 280 nm indica uma alteração no ambiente dos resíduos de aminoácidos (Tirosina, Triptofano e Fenilalanina) (Topala *et al.* 2014; Xu *et al.* 2013).



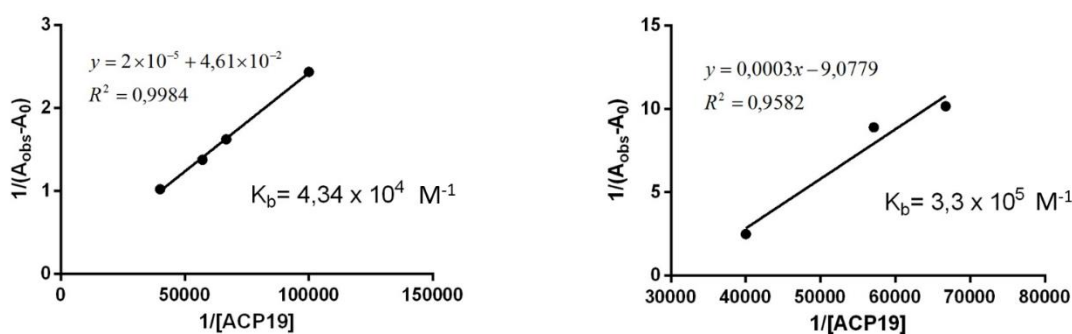
**Figura 4.21 – Espectro de absorção da formação do complexo {ACP19-BSA} por espectroscopia UV-Vis.** A) Interação do ACP19 a diferentes concentrações (10 a 25  $\mu$ M) com  $C_{BSA}$  constante (2  $\mu$ M), em relação ao controlo nas mesmas condições. Todas as soluções foram incubadas a 4°C durante 1h. em tampão fosfato de 10 mM e 0,15M NaCl, pH 6,0 B) Interação do ACP19 a diferentes concentrações (10 a 25  $\mu$ M) com  $C_{BSA}$  constante (2  $\mu$ M), em relação ao controlo nas mesmas condições. Todas as soluções foram incubadas 37°C durante 24h. Inset: rácio das absorvâncias em relação ao controlo. Os resultados são de dois ensaios independentes



**Figura 4.22 - Espectro de absorção da formação do complexo {ACP19-HSA} por espectroscopia UV-Vis.** Interação do ACP19 a diferentes concentrações (10 a 25  $\mu\text{M}$ ) com  $C_{\text{BSA}}$  constante (2  $\mu\text{M}$ ), incubadas 37°C durante 24h em tampão fosfato de 10 mM e 0,15M NaCl, pH 6,0. *Inset:* rácio das absorvâncias em relação ao controlo. Os resultados são de dois ensaios independentes.

Os ensaios realizados com a interação do complexo com as proteínas apenas foram efetuados para o ACP19. O espectro de UV-Vis foi traçado usando uma concentração fixa de BSA e HSA (2  $\mu\text{M}$ ) na presença e na ausência de concentrações crescentes do complexo ACP19. Como controlo traçou-se espectros com contrações variáveis na ausência de BSA. Em relação à incubação com do complexo com HSA, o desconto do controlo foi feito automaticamente através da *baseline*. Como se pode observar na Figura 4.22 o máximo de absorvância a 278 nm corresponde aos resíduos de triptofano e tirosina da BSA (Xu *et al.* 2013). Ao observar-se o espectro do complexo incubado com a BSA a diferentes temperaturas (4 e 37°) (Figura 4.21) e HSA a 37° (Figura 4.22) verifica-se um efeito hipercrómico e um efeito batocrómico que é compatível com a existência de uma interação (Xu *et al.* 2013). Estes resultados demonstram a existência de uma interação entre o ACP19 e as proteínas.

De forma a determinar a constante de ligação, para o complexo {BSA-ACP19} (1:1) e para o complexo {HSA-ACP19} (1:1), utilizou-se a equação de Benesi-Hildebran (Equação 3.5)



**Figura 4.23 – Representação de Benesi-Hildebran para o cálculo de  $K_b$  para o complexo {ACP19-BSA} (esquerda, incubados durante 24h a 37°C) e {ACP19-HSA} (direita, incubados durante 24h a 37°C).** Assume-se uma estequiometria de 1:1 para o aducto ACP19-proteína formado. Os valores experimentais foram retirados dos espectros UV-vis das soluções de trabalho (com uma concentração fixa de 2  $\mu\text{M}$  de proteína e concentração variável de complexo (10 a 25  $\mu\text{M}$ ) no tampão de em tampão fosfato de 10 mM e 0,15M NaCl, pH 6,0, usando a absorvância medida a 289 nm no ACP19. Os resultados são de dois ensaios independentes.

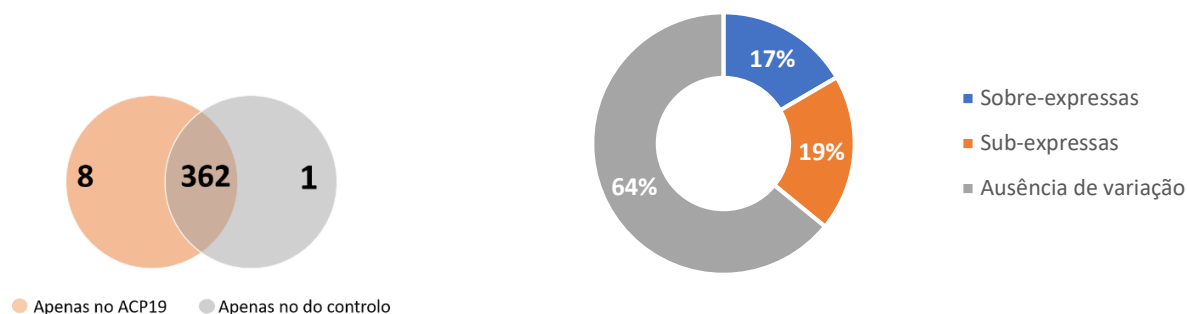
Assumindo a estequiometria de 1:1 para o aducto {ACP19-proteína} é possível obter um valor de  $K_b$  de  $4,34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  para o caso de {ACP19-BSA} e de  $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para {ACP19-HSA} (Figura 4.23).

A constante de estabilidade ( $\text{Log } K_b$ ) obtidas na formação de 1:1 para o aducto {ACP19-BSA} foi de 4,64 e de 5,52 para {ACP19-HSA}. Estes valores parecem indicar uma afinidade do complexo muito superior para a HSA em relação à BSA. A afinidade do complexo é muito elevada, indicando que o seu transporte pela HSA no plasma sanguíneo pode ser possível. No entanto, o valor do  $\text{Log } K_b$  obtido é superior ao do KP1019 ( $\text{Log } K_b \sim 4$ ), complexo que se encontra em ensaios clínicos que se sabe ligar-se à HSA de forma reversível. Estes resultados demonstram que o ACP19 poderá possivelmente ser transportado pela albumina no plasma sanguíneo. A elevada afinidade que o ACP19 demonstra ter para a albumina pode ser útil num contexto de *drug delivery*. Assim, estes resultados podem ser utilizados no design de um sistema de *drug delivery* adequado, em que a proteína seja usada para incorporar (e manter) o complexo no sistema vetorizado.

#### 4.7. Proteómica

Com o objetivo de estudar as vias celulares afetadas pela presença do complexo ACP19, procedeu-se ao estudo da avaliação da expressão proteica de células tumorais A2780 após exposição ao  $\text{IC}_{50}$  do complexo durante 48h, através de eletroforese bidimensional.

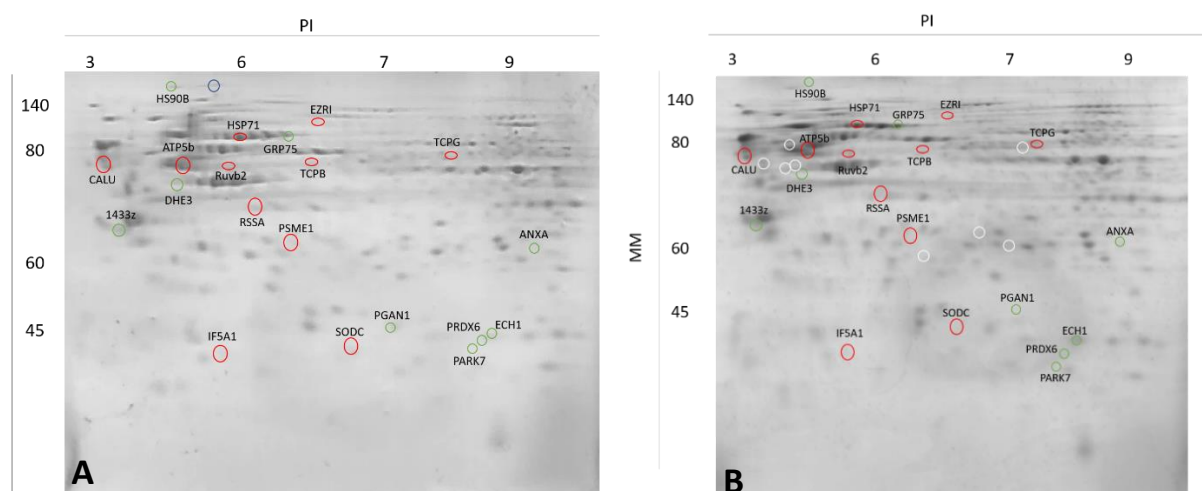
Os géis 2D obtidos foram comparados com o gel de referência HCT116 (Gomes *et al.* 2017) de forma a determinar a variação dos níveis de expressão das proteínas identificadas. Foi utilizado este gel visto que é o gel com mais proteínas identificadas no laboratório *Human Genetics and Cancer Therapeutics*, UCIBIO (DCV, FCT-UNL). O nível de expressão de cada proteína foi calculado pela razão entre a intensidade do spot do complexo e a intensidade do spot no controlo (DMSO), valores inferiores a 0,7 foram considerados sub-expressos e valores superiores a 1,7 sobre-expressos.



**Figura 4.24 – Diferenças no nível da expressão das proteínas na linha tumoral A2780 exposta ao ACP19 comparando com o controlo.** À esquerda está representado o Diagrama de *Venn* entre dois ensaios biológicos, em que 362 proteínas foram identificadas nas células expostas ao DMSO (veículo, controlo) e ao ACP19, 8 proteínas são expressas somente no complexo e 1 proteína é expressa somente no DMSO. No lado direito, está representado a percentagem de proteínas sub-expressas ( $< 0,7$ = e sobre-expressas ( $> 1,5$ ), assim como as proteínas sem expressão significativa ( $0,7 \leq \text{fold} \leq 1,5$ ).

Devido ao facto de o gel de referência pertencer a uma linhagem diferente, a identificação das proteínas foi complicada, sendo que apenas algumas das proteínas expressas foram identificadas. O número de proteínas que foi possível identificar e que exibiram diferenças na expressão das proteínas estão representadas na Figura 4.25 e Tabela 4.5. Através da análise bioinformática e bases de dados, as proteínas identificadas foram classificadas baseado na sua função em varias categorias. A classificação das proteínas em relação à sua função foi feita através do uso do STRING 10.5 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) e da UniProt (*Universal Protein Resource*). As proteínas não identificadas no gel, irão ser picadas do 2D-gel e caracterizadas por Maldi-Tof MS/MS no Instituto Química e Biológica António Xavier.





**Figura 4.25 – Géis resultantes de eletroforese bidimensional de extratos proteicos de células tumorais A2780.** As células foram incubadas com (A) 0,1 % (v/v) de DMSO ou (B) IC50 do ACP19 durante 48 h. Os géis foram analisados no programa Melanie 7.0. Os *spots* identificados representam proteínas com respetiva sigla do nome. Os círculos azuis representam as proteínas apenas expressas no controlo, e os círculos brancos as proteínas expressas apenas no ACP19. As proteínas sobre-expressas estão representadas a verde e as proteínas sub-expressas a vermelho.

**Tabela 4.5 – Proteínas identificadas nos géis resultantes de eletroforese bidimensional com a identificação da variação de expressão relativamente ao controlo.** Valores inferiores a 0,7 (vermelho) foram considerados sub-expressão e valores superiores a 1,5 (verde) foram considerados sobre-expressão.

| UniProt ID         | Identificação da proteína   | Variação da expressão | Função molecular (Termos GO)                 |
|--------------------|---|-----------------------|--|
| CALU_HUMAN         | <i>Calumenin</i>  | 0,5                   | Processos metabólico das proteínas celulares |
| 1433Z_HUMAN        | <i>14-3-3 protein zeta/delta</i>                                  | 1,9                   | Tradução do sinal                            |
| HS90B_HUMAN        | <i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>                             | 1,7                   | Resposta ao stress e Chaperones              |
| HSP71_HUMAN        | <i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>                            | 0,6                   | Resposta ao stress e Chaperones              |
| GRP75_HUMAN        | <i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>                           | 2,2                   | Resposta ao stress e Chaperones              |
| EZRI_HUMAN         | <i>Ezrin</i>  | 0,4                   | Mobilidade do Citoesqueleto                  |
| ATPB_HUMAN (ATP5B) | <i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>                   | 0,4                   | Metabolismo                                  |
| RUVB2_HUMAN        | <i>RuvB-like 2</i>  | 0,5                   | Reparação e replicação do DNA                |
| TCPB_HUMAN         | <i>T-complex protein 1 subunit beta</i>                           | 0,5                   | Resposta ao stress e Chaperone               |
| TCPG_HUMAN         | <i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>                          | 0,6                   | Resposta ao stress e Chaperone               |
| DHE3_HUMAN         | <i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>                   | 1,9                   | Componente turnover                          |
| RSSA_HUMAN         | <i>40S ribosomal protein SA</i>                                   | 0,6                   | Ligação à proteína                           |
| PSME1_HUMAN        | <i>Proteasome activator complex subunit 1</i>                     | 0,5                   | Atividade do ativador endopeptidase          |
| IF5A1_HUMAN        | <i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>              | 0,6                   | Tradução do sinal                            |
| SODC_HUMAN         | <i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>                               | 0,3                   | Componente Turnover                          |
| PGMA1_HUMAN        | <i>Phosphoglycerate mutase 1</i>                                  | 2,8                   | Glicólise                                    |
| PARK7_HUMAN        | <i>Protein DJ-1</i>   | 2,2                   | Autofagia, Resposta ao stress                |
| PRDX6_HUMAN        | <i>Peroxiredoxin-6</i>  | 3,5                   | Component turnover                           |
| ECH1_HUMAN         | <i>Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial</i> | 1,7                   | Metabolismo Lipídico                         |
| ANXA1_HUMAN        | <i>Annexin A1</i>   | 1,7                   | Sistema imunitário                           |

A maioria das proteínas com diferença na expressão estão associadas à resposta ao *stress* e *chaperones* (25%). Das 20 proteínas identificadas, 9 apresentam uma expressão superior a 1,5 e 11 uma expressão inferior a 0,5.

Muitas proteínas estão envolvidas na resposta ao *stress*, nomeadamente o P5CR1, HS90B, HSP71 e GRP75. As HSPs são um grupo grande e heterogêneo de chaperones cuja síntese pode ser induzida por fatores fisiológicos e patológicos, como o choque térmico, stress oxidativo, inflamação, infecção (Zoubeidi & Gleave 2012). Estas proteínas estão presentes no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo e membrana. Vários estudos mostraram que a sub-expressão da HSP71, inibe a proliferação celular *in vitro* e induz a apoptose nas células tumorais, o que é concordante com a indução da apoptose por parte do complexo (Sarto *et al.* 2000). Por outro lado, a proteína HS90B promove a maturação, a manutenção da estrutura e a regulação do ciclo celular. Deste modo, o aumento dos níveis desta proteína representa um mecanismo de defesa na manutenção contra os danos induzidos do complexo. Este aumento está muitas vezes associado com a resistência à quimioterapia, inibindo a apoptose induzida dos agentes quimioterapêuticos. No entanto, verificou-se experimentalmente que o ACP19 era eficaz a induzir apoptose.

As chaperoninas são complexos moleculares essenciais no *folding* das proteínas, de forma a produzir conformações estáveis e funcionais. Um dos membros deste grupo das proteínas são os TCP1, em que os genes independentes em cromossomas separados codificam as subunidades desta proteína. O substrato primário para o TCPB (*T-complex protein 1 subunit β*) são as proteínas do citoesqueleto, incluído tubulinas, actinas, e proteínas envolvidas no ciclo celular (Coghlin *et al.* 2006). Desta forma a sua sub-expressão está relacionada com a progressão do ciclo celular, indicando que poderá ocorrer um atraso no ciclo celular, como se observou anteriormente com o ensaio da progressão do ciclo célula. A calumenina (CALU) é uma proteína de ligação ao  $Ca^{2+}$  pertencente à família CREC, (*Cab45*, *Reticulocalbin*, *ERC-55*, *Calumenin*). Esta proteína encontra-se normalmente no retículo endoplasmático, no entanto pode ser transportada para o citoplasma após a paragem do ciclo celular ou em apoptose tardia, apresentando-se reduzida no citoplasma durante a fase inicial da apoptose. Neste caso após a exposição do ACP19 às células A2780, observou-se uma sub-expressão desta proteína, o que indica que as células se encontram, na sua maioria, em apoptose inicial. Este resultado é consistente com os resultados da dupla marcação com Anexina V-FITC e IP, visto que a maioria das células se encontrava em apoptose inicial (Bull *et al.* 2010; Huang & Chan 2002).

As proteínas SOD1, PRDX6 e PARK7 estão envolvidas na resposta às espécies reativas de oxigénio. Estas proteínas apresentam como função proteger as células de danos oxidativos, pela a eliminação de ROS. A PRDX6 é uma proteína bifuncional com atividade fosfolipase A2 e peroxidase. Esta proteína é uma importante enzima antioxidante e os autores Manevich e Fisher demonstraram que a proteína estava sobre-expressa de forma estável em células protegidas contra o stress oxidativo (Chang *et al.* 2007; Dytfeld *et al.* 2016). A PRDX6 e a PARK7 encontram-se sobre-expressas, enquanto que a SOD1 está sub-expressa, o que não está de acordo com os resultados anteriormente observados, visto que não se verificou a formação de ROS (Figura 4.11). No entanto, supõem-se que a linha celular A2780 é menos propensa ao dano induzido por ROS quando exposta a uma certa quantidade de complexo (Karsani *et al.* 2014).

O PSME1 está implicado na montagem do imunoproteossoma e é necessário para o processamento eficiente do antigénio. O proteossoma é um complexo proteínase multicatalítico que é responsável pela degradação da maioria das proteínas intracelulares, incluindo proteínas que são cruciais para a regulação do ciclo celular e para morte celular programada. Curiosamente, a análise proteómica mostrou uma

diminuição da abundância destas proteínas, apesar de a atividade do proteossoma ser esperado aumentar na maioria dos cânceros (Karsani *et al.* 2014).

A anexina A1 (ANXA1) pertence a família das proteínas de ligação a fosfolípidos e cálcio, estando envolvida no processo anti-inflamatório, regulação da diferenciação, proliferação e apoptose (Lecona *et al.* 2008). Foi descrito que o aumento da expressão desta proteína promove a apoptose com a ativação da caspase3 (Parente & Solito 2004; Beck *et al.* 2010). A ANXA1 encontra-se sobre-expressa na presença do complexo, o que pode indicar a capacidade do ACP19 induzir o processo apoptótico tal como foi verificado nos ensaios de dupla marcação com anexina V-FITC e IP.

De importância central para as vias metabólicas são os aminoácidos glutaminas e glutamato, as principais enzimas envolvidas na sua síntese estão localizadas quase exclusivamente na mitocôndria. O DHE3 é um enzima envolvido na regulação da atividade metabólica, estando localizado na superfície interna da membrana mitocondrial participando na síntese de glutamato (Derry *et al.* 2015). Verifica-se que esta proteína está envolvida no principal mecanismo de produção de ATP em células tumorais. A sua sobre-expressão dá indicação que as células aumentam a sua atividade metabólica em resposta à presença de composto. O ATP5B, é uma proteína envolvida na catalise da síntese de ATP na mitocôndria e ao encontrar-se sobre-expressa dá a indicação do aumento metabólico da célula com o consequente aumento da produção de ATP. Tendo em conta que o complexo induz disrupção da membrana mitocondrial, a sua sub-expressão indica a dissociação da ATPB e a sua inativação, devido aos danos provocados pelo complexo na mitocôndria

Sumarizando estes resultados, o estudo do proteoma de células A2780 expostas ao ACP19, revelou que as células são mais sensíveis e propensas à morte celular, devido da HSP71, mas também devido à proteína CALU, uma proteína que se encontra sub-expressa durante a fase inicial da apoptose, como se verificou nos resultados da dupla marcação da Anexina V-FITC e IP (Figura 4.5, Tabela 4.3). Além disso, a ANXA1 (proteína envolvida na proliferação e apoptose) confirma a capacidade do ACP19 induzir o processo apoptótico. As proteínas envolvidas na resposta ao stress oxidativo, como a PRDX6 e a PARK7 encontram-se sobre-expressas, o que não se observa nos resultados obtidos no ensaio de ROS, em que não se verificou a formação de espécies reativas (Figura 4.11).

O DHE3 e o ATP5B são proteínas que estão localizadas preferencialmente na mitocôndria e têm um papel essencial no mecanismo de produção do ATP. A sobre-expressão da proteína DHE3 indica um aumento metabólico nas células e a necessidade de síntese de novas proteínas, assim como a iniciação de cascatas biológicas. A sub-expressão da proteína ATP5B, demonstra que é possível que a mitocôndria apresente danos, provocando a dissociação desta proteína e a sua inativação, como se observou na avaliação do potencial da membrana mitocondrial, em que o complexo induz disrupção da membrana mitocondrial (Figura 4.8)

Portanto estes resultados revelaram dois tipos de resposta: uma que se encontra diretamente associada ao efeito antiproliferativo do complexo e um segundo efeito que resulta da tentativa de sobrevivência da célula aos danos introduzidos pela ação do complexo de Ru(II) ACP19.

## 5. Conclusão e Perspetivas futuras

**Tabela 5.1 – Resumo dos efeitos observados nos ensaios biológicos realizados pelos complexos ACP19 e SA25 na linha tumoral A2780.**

| Ensaio Biológico                          | Alterações                                      | Efeito na linha tumoral                                |             |
|---|---|--|-------------|
|   |   | ACP19  | SA25        |
| Marcação com a sonda Hoechst e IP         | Alterações morfológicas                         | +  | +           |
| Marcação com Anexina V-FITC e IP          | Indução da apoptose                             | +  | +           |
| Avaliação do $\Delta\Psi$                 | Disrupção do potencial da membrana mitocondrial | +  | +           |
| Níveis das proteínas BAX e BCL-2          | Rácio BAX/BCL-2                                 | Aumentado  | Aumentado   |
| Produção intracelular de ROS              | Formação de ROS                                 | Ø  | Ø           |
| Marcação com a sonda Hoechst e Cyto Green | Indução de autofagia                            | +  | +           |
| Localização Subcelular                    | Maior percentagem Acumulação                    | Mitocôndria  | Mitocôndria |
| Ciclo celular                             | Atraso no ciclo celular                         | +  | Ø           |
| Interação com o DNA                       | Clivagem do DNA                                 | Ø  | Ø           |
|   | Modo de ligação ao DNA                          | Sulcos   | Sulcos      |
|   | Dicroísmo circular                              | Alteração  | Nd          |
| Interação com proteínas do soro           | BSA   | +  | Nd          |
|   | HSA   | +  | Nd          |
| Proteómica                                | Proteínas sobre/sub expressas                   | HSP71, CALU, ANCXA1, PRDX6, PARK7, DHE3, ATP5B e HS90B | Nd          |

Ø – Sem efeito, + – Com efeito, Nd – Não determinados

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, e apesar dos esforços no desenvolvimento de novas terapêuticas, os efeitos secundários severos e a resistência intrínseca ou adquirida por parte das células tumorais continuam a ser dos principais problemas a ultrapassar. Desta forma é de extrema importância a síntese e o desenvolvimento de novos complexos com capacidades melhoradas. Neste sentido, a pesquisa pré-clínica e clínica é primordial para a avaliação biológica de novos agentes anticancerígenos.

A avaliação do potencial antiproliferativo de complexos ACP19, SA25, SA22 e SA23 e os respetivos ligandos HL1, HL2, HL3 e HL4 foi realizada em quatro linhas celulares tumorais, A2780 (carcinoma do ovário), HCT117 (carcinoma colorectal), MCF7 (adenocarcinoma da mama) e A549 (carcinoma do pulmão) e uma linha celular saudável (Fibroblastos). Todos os complexos revelaram um efeito antiproliferativo para as linhas celulares A2780 e HCT116, no entanto, dentro dos ligandos, apenas o ligando HL1 e HL4 revelaram um efeito antiproliferativo na linha tumoral A2780. Os complexos ACP19 e SA25 revelaram um maior efeito antiproliferativo na linha celular A2780 com um IC<sub>50</sub> de 0,6 µM e 0,5 µM, respetivamente. Estes valores são inferiores ao IC<sub>50</sub> determinado para a cisplatina e semelhante ao valor calculado para a doxorrubicina. De seguida, avaliou-se a toxicidade dos complexos em células

saudáveis de fibroblastos determinando valores de IC<sub>50</sub> de 11,5 µM para o ACP19 e 16,6 µM para o SA25, indicando que os complexos possuem uma atividade dirigida, reduzindo a produção de efeitos secundários. Os complexos ACP19 e SA25 foram os escolhidos na realização dos próximos ensaios biológicos na linha tumoral A2780, devido à maior seletividade e maior efeito antiproliferativo observada por estes complexos.

A apoptose pode ser um dos mecanismos associados à capacidade antiproliferativa dos complexos. Deste modo, avaliou-se o potencial apoptótico dos complexos através da marcação das células A2780 com Hoechst 33258, observando-se condensação da cromatina e fragmentação nuclear, características típicas de apoptose. No entanto, não se observou células em necrose com a marcação com IP. Através da dupla marcação com anexina V-FITC e IP por citometria de fluxo demonstrou a diminuição de aproximadamente 50% das células viáveis e um aumento das células em apoptose inicial e tardia, confirmando o processo apoptótico induzido por estes complexos. As alterações do potencial da membrana mitocondrial sugerem um mecanismo associado à via intrínseca da apoptose por parte destes complexos, no qual foi confirmado pela análise do *western-blot*, demonstrando um aumento da razão BAX/BCL-2. Visto que, a perda do potencial da membrana mitocondrial provoca a translocação da proteína BAX para a mitocôndria, libertando o citocromo c para o citosol. O estudo da localização subcelular dos complexos permitiu confirmar que a mitocôndria poderá ser o principal alvo, resultado este que está de acordo com a perda do potencial mitocondrial observado. Adicionalmente, observou-se que a exposição dos complexos nas células A2780 poderiam induzir outro mecanismo de morte celular, nomeadamente a morte celular autofágica.

As células A2780 expostas ao complexo ACP19 parecem apresentar um ligeiro atraso na progressão do ciclo celular, uma vez que, após 9h de incubação apresentam maior número de células em G2/M comparativamente com a amostra controlo. Em relação ao complexo SA25 não se observou nenhum atraso nem paragem na progressão do ciclo celular. Contudo, o efeito observado pelo complexo ACP19 não foi muito acentuado pelo que serão necessários outros estudos que comprovem este atraso verificado. Numa primeira abordagem seria interessante distinguir entre a fase G2 e a mitose, através de uma análise do índice de mitose (utilizando o anticorpo *phospho-histone H3*). Por outro lado, poder-se-ia utilizar os anticorpos *Phospho-cyclin B1* ou o *phospho Histone-3* de forma a observar os níveis das proteínas por *Western-Blot*.

Estudos *in vitro*, nomeadamente titulações UV, dicroísmo circular e a clivagem do DNA, revelaram que os complexos não provocam dano no DNA. Verificou-se a presença de hipercroísmo e de batocromismo no espectro de absorção do complexo ACP19, e a presença hipocroísmo e batocromismo no complexo SA25, com o aumento da concentração de CT-DNA em solução. Este resultado é consistente com uma possível ação sobre o DNA por interação com o sulco. As titulações UV permitiram ainda determinar as constantes de afinidade para o DNA, revelando uma elevada capacidade de interação entre os complexos e o DNA. O dicroísmo circular permitiu confirmar que o DNA não será o principal alvo destes complexos, como observado pelos ensaios da localização subcelular. No entanto, seria importante avaliar a interação do ACP19 com o DNA, utilizando uma concentração de complexo muito superior de forma a conseguir detetar um eventual sinal de ICD. Neste caso, não foi possível avaliar a interação do SA25 com o DNA por dicroísmo circular. Por outro lado, os ensaios da mobilidade electroforética mostraram que a interação do complexo com o DNA, era fraca ou inexistente, revelada pela incapacidade dos complexos alterarem a conformação do DNA plasmídico. No entanto, como perspetiva futura poder-se-ia realizar ensaios de competição de ligação ao DNA entre os complexos e o *GelRed* por espectroscopia de fluorescência, de forma a confirmar o tipo de interação.

Visto que o DNA não é possivelmente o principal alvo destes complexos estudou-se a interação do complexo ACP19 com as proteínas do soro, nomeadamente BSA e HSA, observando uma interação específica entre o complexo e a proteína, sendo superior a afinidade do complexo para a HSA em relação à BSA. Estes resultados indicam que o complexo poderá eventualmente ser transportado pela albumina no plasma sanguíneo. A elevada afinidade demonstrada pelo ACP19 com a albumina pode ser útil no *design* de um sistema de *drug delivery* adequado (ex. nanopartículas).

A análise do proteoma da linha celular A2780 quando exposta ao complexo ACP19 revelou alterações em algumas proteínas envolvidas no processo apoptótico, resposta ao stress oxidativo e manutenção do citoesqueleto. As proteínas HSP estão normalmente associadas a um mecanismo de resistência à apoptose, como a HS90B, no entanto a sub-expressão da proteína HSP71 pode levar à morte celular programada, através da inibição da proliferação. As proteínas envolvidas na proteção contra o stress oxidativo, como a PRDX6 e a PARK7, encontravam-se sobre-expressas. No entanto, na avaliação da formação de ROS em células A2780 não revelou o envolvimento deste radical na morte celular induzida pelo o complexo. Portanto, seria necessário realizar outros ensaios, de formar a observar se o complexo induz a formação de ROS, nomeadamente determinar a atividade de enzimas envolvidas no stress oxidativo, tais como a catalase e o superóxido dismutase, visto que a mitocôndria é uma das principais fontes na produção de ROS (Kalyanaraman *et al.* 2012). Uma vez que se verificou a ativação de algumas proteínas envolvidas em mecanismos de resistência, seria importante proceder ao estudo do proteoma em células incubadas com o complexo durante diferentes períodos de tempo de forma a avaliar a variação da expressão dessas proteínas, obtendo respostas mais concretas acerca do mecanismo de ação do ACP19. De forma a confirmar estes resultados, será realizada espectrometria de massa.

Resumindo, a análise proteómica confirmou os resultados obtidos, ou seja, que o complexo ACP19 induz apoptose, possivelmente pela a via intrínseca da apoptose. Em relação ao SA25, não foi possível realizar a análise do proteoma da linha celular A2780 quando incubado com este complexo, no entanto seria importante realizar esta análise de forma a confirmar os seus alvos moleculares.

Em geral, os aspetos celulares e bioquímicos únicos de cada tumor, como a sua heterogeneidade e natureza estão em constante evolução e continuam a prejudicar o sucesso das terapias atualmente estabelecidas. Os estudos *in vitro* bem estabelecidos, como aqueles aqui empregues são cada vez mais importantes, uma que vez que o interesse de uma melhor qualidade de tratamento é cada vez mais exigido. Além do desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, novos sistemas de *drug delivery* baseados em dispositivos à escala nano mostram propriedades farmacocinéticos e farmacodinâmicas melhoradas, como a biodisponibilidade aumentada, surgiram na ultima década como soluções promissoras para a eficácia terapêutica necessária.

## 6. Referências

- Abid, M., Shamsi, F. & Azam, A., 2016. Ruthenium Complexes: An Emerging Ground to the Development of Metallopharmaceuticals for Cancer Therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(10), pp.772–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26423699>.
- Agarwal, R. & Kaye, S.B., 2003. Ovarian cancer: Strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature Review Cancer*, 3(July), pp.502–516. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835670>.
- Agarwal, S., Jangir, D.K. & Mehrotra, R., 2013. Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Mar 5;120, pp 177-82 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.11.001>.
- Alama, A. et al., 2009. Organometallic compounds in oncology : implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug Discovery Today*, 14 (9-10), pp.500–507. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429510>
- Alberts, B. et al., 2007. *Molecular Biology of the cell* Fifth Edit. G. Science, ed., New York.
- Alsop, K. et al., 2012. BRCA Mutation Frequency and Patterns of Treatment Response in BRCA Mutation – Positive Women With Ovarian Cancer : A Report From the Australian Ovarian Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 20(July), 30(21), pp 2654-63. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711857>
- Anand, P. et al., 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), pp.2097–2116. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2515569/>
- Anitha, P. et al., 2013. Biology Synthesis , characterization , DNA interaction , antioxidant and anticancer activity of new ruthenium ( II ) complexes of thiosemicarbazone / semicarbazone bearing. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 129, pp.17–26. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.09.005>.
- Anon, *SEER Cancer Statistics Reviews*, Available at: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/results\\_merged/topic\\_lifetime\\_risk.pdf](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/results_merged/topic_lifetime_risk.pdf) [Accessed August 18, 2017].
- Ashkenazi, A., 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19 (3-4), pp.325–331. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495520>
- Ashkenazi, A. & Salvesen, G., 2014. Regulated Cell Death : Signaling and Mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 30, pp.337–356. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25150011>
- Ashkenazi, R., Gentry, S.N. & Jackson, T.L., 2008. Pathways to Tumorigenesis — Modeling Mutation Acquisition in Stem Cells and Their Progeny 1. *Neoplasia*, 10(11), p.1170–1182, IN1–IN6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1593/neo.08572>.
- Assis, A.So.R.F. da C., 2015. *Síntese de novos complexos de iões metálicos e avaliação do seu potencial como metalofármacos*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Backorová, M. et al., 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26 (3), pp.462–468. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285236>
- Beck, H.C. et al., 2010. Proteomic profiling of human colon cancer cells treated with the histone deacetylase inhibitor belinostat. *Electrophoresis*, 31(16), pp.2714–2721. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20717991>
- Beckford, F. et al., 2011. Synthesis and structure of [(g6 -p-cymene)Ru(2-anthracen-9-ylmethyleneN-ethylhydrazinecarbothioamide)Cl]Cl; biological evaluation, topoisomerase II inhibition and reaction with DNA and human serum albumin. *Metallomics*, 3(5), pp.491–502. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347491>
- Beckford, F.A. et al., 2009. Microwave synthesis of mixed ligand diimine–thiosemicarbazone complexes of ruthenium(II): biophysical reactivity and cytotoxicity†. *Dalton Trans.*, pp.10757–10764. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2814159/>
- Beckford, F.A. et al., 2011. Synthesis and characterization of mixed-ligand diiminepiperonal thiosemicarbazone complexes of ruthenium(II): Biophysical investigations and biological evaluation as anticancer and antibacterial agents. *Journal of Molecular Structure*, 992(870),

- pp.39–47. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21552381>
- Bergamo, A. et al., 2012. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106(1), pp.90–99. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030>.
- Bergamo, A. et al., 2009. Inhibitory Effects of the Ruthenium Complex KP1019 in Models of Mammary Cancer Cell Migration and Invasion. *Metal-Based Drugs*, pp.1–9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748298/>
- Bergamo, A. & Sava, G., 2011. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 40(31), pp.7817–7823. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21629963>
- Bergers, G., Benjamin, L.E. & Francisco, S., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(June), pp.401–10. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778130>
- Bertram, J.S., 2001. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), pp.167–223. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173079>
- Bisceglie, F. et al., 2016. Autophagy and apoptosis: studies on the effects of bisthiosemicarbazone copper(II) complexes on p53 and p53-null tumour cell lines. *Metallomics*.8(12), pp 1255-1265. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27841435>
- Bostock, C.J., Prescott, D.M. & Kirkpatrick, J.B., 1971. An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Experimental Cell Research*, 68, pp.163–168. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5165443>
- Brabec, V. & Nováková, O., 2006. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug resistance Updates*, 9(3), pp.111–122. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790363>
- Brumatti, G., Sheridan, C. & Martin, S.J., 2008. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, 44(3), pp.235–240. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314054>
- Brun, P. et al., 2012. In vitro response of osteoarthritic chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes to a 500 – 730 kDa hyaluronan amide derivative. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 100(8), pp 2073-81. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22865740>
- Bull, V.H. et al., 2010. Temporal proteome profiling of taxol-induced mitotic arrest and apoptosis. *Electrophoresis*, 31(11), pp.1873–1885. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20506421>
- Calderón-montaño, J.M. et al., 2014. Effect of DNA Repair Deficiencies on the Cytotoxicity of Drugs Used in Cancer Therapy - A Review. *Current Med Chem*, 21(30), pp.3419–3454. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934343>
- Cao, P. et al., 2011. Growth Inhibition and Induction of Apoptosis in SHG-44 Glioma Cells by Chinese Medicine Formula “ Pingliu Keli .” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp.1–9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20953401>
- Cao, W., Zheng, W. & Chen, T., 2015. Ruthenium Polypyridyl Complex Inhibits Growth and Metastasis of Breast Cancer Cells by Suppressing FAK signaling with Enhancement of TRAIL-induced Apoptosis. *Scientific Reports*, 5, p.9157. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/srep09157>.
- Casini, A. et al., 2008. Emerging Protein Targets for Anticancer Metallodrugs : Inhibition of Thioredoxin Reductase and Cathepsin B by Antitumor Ruthenium ( II ) - Arene Compounds. *J. Med. Chem*, 51(21), pp.6773–6781. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834187>
- Castedo, M. et al., 2002. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, 265, pp.39–47. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072177>
- Chai, S., To, K.K.W. & Lin, G., 2010. Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines. *Chinese medicine*, 5, pp.5–26. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20653978>
- Chaires, J.B., 2006. A thermodynamic signature for drug – DNA binding mode. *Biochemistry and Biophysics*, 453(1), pp.26–31. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730635>



- Chambers, A., 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), pp 563-72. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154349>
- Chang, X. et al., 2007. Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of breast cancer. *Breast cancer Research*, 9(6), pp.1–15. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2246172/>
- Cheffer, A., Tárnok, A. & Ulrich, H., 2013. Cell Cycle Regulation During Neurogenesis in the Embryonic and Adult Brain. *Stem Cell Rev*, 9(6), pp 794-805. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23900682>
- Cheng, X. et al., 2003. Studies on Repository Compound Stability in DMSO under Various Conditions. *Journal of Biomolecular Screening*, 8(3), pp.292–304. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857383>
- Chien, J. et al., 2013. Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer : the role of tumor microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 3(September), pp.1–7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3781360/>
- Clavel, C.M. et al., 2015. Modulating the Anticancer Activity of Ruthenium ( II ) -arene Complexes. *Journal Medicine chemistry*, 59(8), pp.1–34. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm501655t>
- Coghlin, C. et al., 2006. Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *Journal Pathology*, 210(3), pp.351–357. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16981251>
- Colombo, N. et al., 2010. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 21(SUPPL. 5), pp.23–30. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078660>
- Côrte-Real, L. et al., 2013. Cellular uptake mechanisms of an antitumor ruthenium compound: the endosomal/lysosomal system as a target for anticancer metal-based drugs. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 19(5), pp.1122–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790186>
- Côrte-Real, L. et al., 2015. The key role of coligands in novel ruthenium(II)-cyclopentadienyl bipyridine derivatives: Ranging from non-cytotoxic to highly cytotoxic compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 150(Ii), pp.148–159. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.06.015>
- Coward, J.I.G., Middleton, K. & Murphy, F., 2015. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer. *International Journal of Women's Health*, 7, pp.189–203. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324539/>
- Demoro, B. et al., 2013. Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism. *Dalton Trans.*, 42(19), pp. 7131-46. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519281>
- Denton, D., Nicolson, S. & Kumar, S., 2011. Cell death by autophagy : facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.*, 19(1), pp.87–95. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.146>
- Derry, M.M. et al., 2015. Target Identification of Grape Seed Extract in Colorectal Cancer using Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) Technique: Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response Proteins. *Curr Cancer Drug Targets*, 14(4), pp.323–336. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24724981>
- Deryugina, E.I. & Quigley, J.P., 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Review*, 25(1), pp.9–34. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680569>
- Di, L. & Kerns, E.H., 2006. Biological assay challenges from compound solubility : strategies for bioassay optimization. *Drug Discovery Today*, 11(May), pp.446–451. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635808>
- Dickson, M.A. et al., 2014. Molecular Pathways : CDK4 Inhibitors for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(13), pp 3379-83. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24795392>
- Dong, J.T., 2006. Prevalent mutations in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(3),

- pp.433–447. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267836>
- Duvvuri, M. et al., 2004. A Cell Fractionation Approach for the Quantitative Analysis of Subcellular Drug Disposition. *Pharmaceutical Tesearch*, 21(1), pp.26–32. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:PHAM.0000012148.12516.3f>
- Dytfeld, D. et al., 2016. Comparative proteomic profiling of refractory / relapsed multiple myeloma reveals biomarkers involved in resistance to bortezomib-based therapy. *Orcotarget*, 7(35), pp 56725-56736. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27527861>
- Efthimiadou, E.K., Karaliota, A. & Psomas, G., 2010. Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin : Structure and biological evaluation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(4), pp.455–466. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.12.019>.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology*, 35(4), pp.495–516. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>
- Fidler, I.J., 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(June), pp.453–8. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778135>
- Flocke, L.S., Trondl, R. & Jakupec, M.A., 2016. Molecular mode of action of NKP-1339 – a clinically investigated ruthenium-based drug – involves ER- and ROS-related effects in colon carcinoma cell lines. *Investigational New Drugs*, pp.261–268. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-016-0337-8>.
- Fulda, S. & Debatin, K., 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), pp.4798–4811. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892092>
- Fulda, S. & Kögel, D., 2015. Cell death by autophagy : emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*, 34(40), pp.5105–13. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25619832>
- Galluzzi, L. et al., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and Differentiation*, 19(1), pp.107–120. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760595>
- Galluzzi, L. et al., 2014. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell death & disease*, 5(5), p.e1257. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.428>.
- Garrett, M.D., 2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81(5), pp.515–522.
- Giussani, P. et al., 2014. Sphingolipids : Key Regulators of Apoptosis and Pivotal Players in Cancer Drug Resistance. *Int J Mol Sci*, 3(2), pp.4356–4392. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625663>
- GLOBACAN, 2008. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization*. Available at: <http://globocan.iarc.fr> [Accessed February 12, 2017].
- Gomes, A., Fernandes, E. & Lima, L.F.C., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. , 65, pp.45–80. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
- Gomes, S.E. et al., 2017. Proteomic analysis of HCT116 colon cancer cells overexpressing miR-143 and miR-145. *Sientific Reports*.
- Gordon, R.R. & Nelson, P.S., 2012. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resistance Updates*, 15(1–2), pp.123–131. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2012.01.002>.
- Gozuacik, D. & Kimchi, A., 2007. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol.*, 78(6), pp.217–245.
- Gransbury, G.K. et al., 2016. Comparison of KP1019 and NAMI-A in tumour-mimetic environments. *Metallomics*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C6MT00145A>.
- Gupta, G.P. & Massagué, J., 2006. Cancer Metastasis : Building a Framework. *Cell*, 127, pp.679–695.
- Hahn, W.C. & Weinberg, R.A., 2002. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(5), pp.331–341. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044009>.
- Han, W. et al., 2011. Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. *Journal of Organometallic Chemistry*, 696(5), pp.989–998. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.11.009>.
- Han, W. & Dyson, P.J., 2006. Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs :

- Towards Targeted Chemotherapy. *Eur. J. Inorg. Chem*, 20, pp.4003–4018.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
- Hannon, M.J., 2007. Metal-based anticancer drugs : From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology. *Pure and Applied Chemistry*, 79(12), pp.2243–2261. Available at: <https://doi.org/10.1351/pac200779122243>
- Harbour, J.W. & Dean, D.C., 2000. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nature cell biology*, 2(April), pp.65–67. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783254>
- Hassan, M. et al., 2014. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research Internacional*, 2014, p.23. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25013758>
- Hu, W. & Kavanagh, J.J., 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol.*, 4(12), pp.721–729. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662428>
- Hu, Y. et al., 2006. Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin. *Jornal of Photochemistry and Photobiology A: CHemistry*, 179, pp.324–329. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603005004417>
- Huang, C. & Chan, S.H.H., 2002. Proteomic analysis of lipopolysaccharide-induced apoptosis in PC12 cells. *Proteomics*, 2, pp.1220–1228. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12362339>
- Hussein, M.A. et al., 2015. Synthesis , structural elucidation and cytotoxicity of new thiosemicarbazone derivatives. *Arabian Journal Chemistry*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.013>.
- Ichim, G. & Tait, S.W.G., 2016. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Publishing Group*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.58>.
- Jamalzadeh, L. et al., 2016. Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7 , RAW-264 . 7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Avicenna J. Med.Biochem.*, 4(1), pp.1–6.
- Jayson, G.C. et al., 2014. Ovarian cancer. *The Lancet*, 6736(13). Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62146-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62146-7).
- Jia, J. et al., 2014. Inducing apoptosis effect of caffeic acid 3 , 4-dihydroxy-phenethyl ester on the breast cancer cells. *Tumor Biol.*, 35, pp.11781–11789. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25190016>
- Johnstone, R.W. et al., 2002. Apoptosis : A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell*, 108, pp.153–164. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832206>
- Kalanur, S.S., Katrahalli, U. & Seetharamappa, J., 2009. Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of an anticancer drug with DNA and their analytical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 636(1–2), pp.93–100. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.09.018>.
- Kalyanaraman, B. et al., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fl uorescent probes : challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), pp.1–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.
- Karsani, S.A. et al., 2014. Comparative proteomics analysis of oral cancer cell lines : identification of cancer associated proteins. *Proteome Science*, 12(3). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3974152/>
- Katiyar, S.K., Roy, A.M. & Baliga, M.S., 2005. Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2 / Bax , cytochrome c release , and caspase activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(February), pp.207–217. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713892>
- Kigawa, J., 2013. New Strategy for Overcoming Resistance to Chemotherapy of Ovarian Cancer. *Yonago Acta medica*, 56(2), pp.43–50. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771207/>
- Kim, J., Kim, J. & Bae, J., 2016. ROS homeostasis and metabolism : a critical liaison for cancer therapy. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(11), pp.e269-13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2016.119>.
- Koch, A. et al., 2005. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya.

- Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), pp.95–99. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878245>
- Kostova, I., 2006. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 13, pp.1085–1107. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611086>
- Kourtis, N. & Tavernarakis, N., 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ*, 16(1), pp.21–30. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079286>
- Kroemer, G. & Levine, B., 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9(12), pp.1–7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971948>
- Kuhn, P.-S. et al., 2015. Improved reaction conditions for the synthesis of new NKP-1339 derivatives and preliminary investigations on their anticancer potential. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 44(2), pp.659–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25385191>.
- Lawrence, D., Vaidyanathan, V.G. & Nair, B.U., 2006. Synthesis , characterization and DNA binding studies of two mixed ligand complexes of ruthenium ( II ). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(7), pp.1244–1251. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554091>
- Lecona, E. et al., 2008. Upregulation of Annexin A1 Expression by Butyrate in Human Colon Adenocarcinoma Cells : Role of p53 , NF- $\kappa$ B , and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase *Molecular and Cellular Biology*, 28(15), pp.4665–4674. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2493359/>
- Leijen, S. et al., 2015. Phase I / II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Invest New Drug*, 33(1), pp.201–214. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344453>
- Lenis-rojas, O.A. et al., 2017. Dinuclear RuII(bipy)2 Derivatives: Structural, Biological, and in Vivo Zebrafish Toxicity Evaluation. *Inorganic Chemistry*, 56(12), pp 7127–7144. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28585811>
- Levina, A., Mitra, A. & Lay, P.A., 2009. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics*, 1(6), pp.458–470. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21305154>
- Li, D. et al., 2011. Characterization of the baicalein e bovine serum albumin complex without or with Cu 2+ or Fe 3+ by spectroscopic approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(2), pp.588–599. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.038>.
- Li, J. et al., 2009. Inhibition of Autophagy by 3-MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Surgical Oncology*, 16(3) pp.761–771. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19116755>
- Li, W. et al., 2014. Ruthenium ( II ) complexes : DNA-binding , cytotoxicity , apoptosis , cellular localization , cell cycle arrest , reactive oxygen species , mitochondrial membrane potential and western blot analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, pp.94–104. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.011>.
- Lim, S. & Kaldis, P., 2013. Cdks , cyclins and CKIs : roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), pp.3079–3093. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861057>
- Lima, A.P. et al., 2014. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. *PLoS ONE*, 9(10), e 105865. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25329644>
- Liu, Y. et al., 2011. Cytotoxicity, Apoptosis, Cellular Uptake, Cell Cycle Arrest, Photocleavage, and Antioxidant Activity of 1, 10-Phenanthroline Ruthenium(II) Complexes . *DNA and Cell Biology*, 30(10), pp.839–848.
- Liu, Y. et al., 2010. Synthesis, DNA-binding, photocleavage, cytotoxicity and antioxidant activity of ruthenium (II) polypyridyl complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(2), pp.564–571. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.043>.
- Lodish, H.F., 2000. *Molecular Cell Biology* 4th edditi., New York: W.H. Freeman.
- Longley, D.B. & Johnston, P.G., 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *Jornal of Pathology*, 205(2), pp.275–292. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15641020>
- Luís, D. V. et al., 2014. Insights into the mechanisms underlying the antiproliferative potential of a Co(II) coordination compound bearing 1,10-phenanthroline-5,6-dione: DNA and protein interaction studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19(6), pp.787–803. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481501>

- Luo, H. et al., 2012. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, pp.304–308. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.006>.
- Luo, J., Solimini, N.L. & Elledge, S.J., 2009. Principles of Cancer Therapy : Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*, 136(5), pp.823–837. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269363>
- Luqmani, Y.A., 2005. Mechanisms of Drug Resistance in cancer chemotherapy. *Medical Principles and Practice*, 14(suppl 1), pp.35–48. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103712>
- Ma, Z. et al., 2016. Synthesis, characterization, thermal properties and antiproliferative potential of copper(II) 4'-phenyl-terpyridine compounds. *Dalton Trans.* Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5DT02744F>.
- Malik, F. et al., 2007. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic cell death of human myeloid leukemia HL-60 cells by a dietary compound withaferin A with concomitant protection by N -acetyl cysteine. *Apoptosis*, 12, pp.2115–2133.
- Martins, P. et al., 2014. Organometallic compounds in cancer therapy: past lessons and future directions. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 14(9), pp.1199–212. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25173559>.
- Medici, S. et al., 2014. Noble metals in medicine : Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*, pp.1–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.08.002>.
- Meggers, E. et al., 2009. Inert ruthenium half-sandwich complexes with anticancer activity. *Dalton Trans.*, (Iii), pp.10882–10888. Available at: 10.1039/B917792B
- Mellor, H.R. & Callaghan, R., 2008. Resistance to Chemotherapy in Cancer : A Complex and Integrated Cellular Response. *Pharmacology*, 81(4), pp.275–300. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18259091>
- Mendelsohn, J. & Gray, J.W., 2014. *The Molecular Basis of Cancer* 4th edditi. ELSEVIER, ed., Philadelphia: Saunders.
- Mihlon, F.I., Ray, C.E. & Messersmith, W., 2010. Chemotherapy Agents : A Primer for the Interventional Radiologist. *Seminars in interventional radiology*, 27, pp.384–390. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3324210/>
- Millimouno, F.M. et al., 2014. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prevention Research*, 7(11), pp.1081–1107. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161295>
- Molina-bolívar, J.A., Galisteo-gonzález, F. & Ruiz, C.C., 2014. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, 156, pp.141–149. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.08.011>.
- Morais, T.S. et al., 2013. Biological activity and cellular uptake of [Ru(η<sup>5</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(PPh<sub>3</sub>)(Me<sub>2</sub>bpy)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] complex. *Jornal of Inorganic Biochemistry*, 122, pp.8–17. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416310>
- Morais, T.S. et al., 2016. Tracking antitumor metallodrugs: promising agents with the Ru(II)- and Fe(II)-cyclopentadienyl scaffolds. *Future Medicinal Chemistry*, 8(5), pp.527–544. Available at: [https://books.google.com/books?id=tUSLclF\\_NoQC&pgis=1%5Cnhttp://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.16.7](https://books.google.com/books?id=tUSLclF_NoQC&pgis=1%5Cnhttp://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.16.7).
- Motswainyana, W.M. & Ajibade, P.A., 2015. Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium ( II ) Coordination Complexes. *Advances in Chemistry*, p.21. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/859730>
- Mühlgassner, G. et al., 2012. Biological activity of ruthenium and osmium arene complexes with modified paullones in human cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 116, pp.180–187. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.003>.
- Nazarov, A.A., Hartinger, C.G. & Dyson, P.J., 2014. Opening the lid on piano-stool complexes: An account of ruthenium(II)arene complexes with medicinal applications. *Journal of Organometallic Chemistry*, 751, pp.251–260. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2013.09.016>.
- Neubig, R.R. et al., 2003. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. *Pharmacological Reviews*, 55(4), pp.597–606. Available at:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657418>
- Nezhat, F.R. et al., 2015. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.03.044>.
- Otto, T. & Sicinski, P., 2017. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Publishing Group*, 17(2), pp.93–115. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.138>.
- Ouyang, L. et al., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), pp.487–498. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030059>
- Pal, T. et al., 2005. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*, 104(12), pp.2807–2816. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284991>
- Palchaudhuri, R. & Hergenrother, P.J., 2007. DNA as a target for anticancer compounds : methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, pp.497–503. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17988854>
- Parente, L. & Solito, E., 2004. Annexin 1 : more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm.res.*, 53, pp.125–132. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060718>
- Pecorino, L., 2012. Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics,
- Pelosi, G., 2010. Thiosemicarbazone Metal Complexes: From Structure to Activity. *The Open Crystallography Journal*, 3(2), pp.16–28.
- Peng, C. et al., 1997. Mitotic and G2 Checkpoint Control : Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Scientific Reports*, 277(5331), pp.1501–1505. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278512>
- Perelman, A. et al., 2012. JC-1 : alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell death and disease*, 3(11), pp.e430-7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2012.171>.
- Pessoa, J.C. & Tomaz, I., 2010. Transport of Therapeutic Vanadium and Ruthenium Complexes by Blood Plasma Components. *Clujul Medica*, 1019(17), pp.3701–3738. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846109>
- Pettersen, K. et al., 2016. DHA-induced stress response in human colon cancer cells – Focus on oxidative stress and autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*, 90, pp.158–172. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.018>.
- Pinto, A.C., Moreira, J.N. & Simões, S., 2010. Combination Chemotherapy in Cancer : Principles , Evaluation and Drug Delivery Strategies. *Current Cancer Treatment*, pp.695–714. Available at: : <https://www.intechopen.com/books/current-cancer-treatment-novel-beyond-conventional-approaches/comboination-chemotherapy-in-cancer-principles-evaluation-and-drug-delivery-strategies>
- Pizarro, A.M. & Sadler, P.J., 2009. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie*, 91(10), pp.1198–1211. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.017>.
- Poeta, A.C., 2015. *Desenvolvimento de potencial metalofármacos para a terapia do cancro*. Faculdade de Ciência da Universidade de Lisboa.
- Psaila, B. & Lyden, D., 2009. The Metastatic Niche: Adapting the Foreign Soil. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), pp.285–293. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308068>
- Putta, V.R. et al., 2016. Synthesis and Evaluation of In Vitro DNA / Protein Binding Affinity , Antimicrobial , Antioxidant and Antitumor Activity of Mononuclear Ru ( II ) Mixed Polypyridyl Complexes. *Journal of Flourescence*, 26(1), pp 225-40. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26555289>
- Qian, C. et al., 2013. The induction of mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells by ruthenium(II) asymmetric complexes. *Metallomics*, 5(7), pp 844-53. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483103>
- Rajesh, J., Rajasekaran, M. & Rajagopal, G., 2012. Analytical methods to determine the comparative DNA binding studies of curcumin – Cu ( II ) complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 97, pp.223–230. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.05.006>.
- Reddy, M.R. et al., 2014. Synthesis , Characterization , DNA Binding , Light Switch “ On and Off” ,

- Docking Studies and Cytotoxicity , of Ruthenium ( II ) and Cobalt ( III ) Polypyridyl Complexes. *Journal of Fluorescence*, 24(3), pp 803-17. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24615259>
- Rijt, S.H. Van & Sadler, P.J., 2009. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today*, 14(December), pp.1089–1097. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2933823/>
- Risbey, J., 2011 Risk Factors and random chances. *Nature*, pp.6–7. Available at: [http://journals.lww.com/pidj/Abstract/2013/02000/Risk\\_Factors\\_and\\_Outcomes\\_of\\_Carbapenem\\_resistant.10.aspx](http://journals.lww.com/pidj/Abstract/2013/02000/Risk_Factors_and_Outcomes_of_Carbapenem_resistant.10.aspx).
- Sadler, P.J. et al., 2006. Structure–Activity Relationships for Cytotoxic Ruthenium(II) Arene Complexes Containing N,N-, N,O-, and O,O-Chelating Ligands. *J. Med. Chem.*, 49, pp.6858–6868. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm060596m>
- Sandal, T., 2002. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The oncologist*, 7, pp.73–81. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854549>
- Sarto, C. et al., 2000. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis*, 21, pp.1218–1226.
- Satyanarayana, A. & Kaldis, P., 2009. Mammalian cell-cycle regulation : several Cdks , numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28(33), pp.2925–2939. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.170>.
- Savage, P. et al., 2009. Why does cytotoxic chemotherapy cure only some cancers ? *Nature clinical practice*, 6(1), pp.43–52. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18982000>
- Sayers, T.J., 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 60(8), pp.1173–1180. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626033>
- Sciences, E.L., 2017. Enzo Life Sciences.
- Shahabadi, N., Falsafi, M. & Moghadam, N.H., 2013. DNA interaction studies of a novel Cu ( II ) complex as an intercalator containing curcumin and bathophenanthroline ligands. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 122, pp.45–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.002>.
- Shahabadi, N., Mohammadi, S. & Alizadeh, R., 2011. DNA Interaction Studies of a New Platinum ( II ) Complex Containing Different Aromatic Dinitrogen Ligands. *Bioinorganic Chemistry and Application*. vol. 2011, Article ID 429241, 8 pages, 2011. doi:10.1155/2011/429241
- Shen, H.-M. & Codogno, P., 2011. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*, 7(5), pp.457–465. Available at: <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.5.14226>.
- Silva, A. et al., 2013. Biological characterization of the antiproliferative potential of Co ( II ) and Sn ( IV ) coordination compounds in human cancer cell lines : a comparative proteomic approach. *Drug metab Drug Interact*, 28(3), pp.167–176. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800656>
- Silva, J., Sebastião, A., et al., 2014. Characterization of the antiproliferative potential and biological targets of a trans ketoimine platinum complex. *Inorganica Chimica Acta*, 423, pp.156–167. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2014.07.067>.
- Silva, J., Fernandes, A.R. & Baptista, P. V, 2014. Application of Nanotechnology in Drug Delivery A. D. Sezer, ed.,
- Sirajuddin, M., Ali, S. & Badshah, A., 2013. Drug – DNA interactions and their study by UV – Visible , fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, pp.1–19. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>.
- Society, A.C., 2017. Cancer Facts & Figures 2017. *American Cancer society*.
- Soediono, B., 2007. *Principles of Cancer Genetics*,
- Stewart, B. & Kleihues, P., 2014. World Cancer Report 2014.
- Tian, Z. et al., 2015. Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine ( MINS ) and bovine serum albumin ( BSA ). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 142, pp.103–109. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.10.013>.
- Tomaz, A.I. et al., 2012. [RuII( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(bipy)(PPh<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>, a promising large spectrum antitumor agent: cytotoxic activity and interaction with human serum albumin. *Journal of inorganic biochemistry*, 117, pp.261–9. Available at:

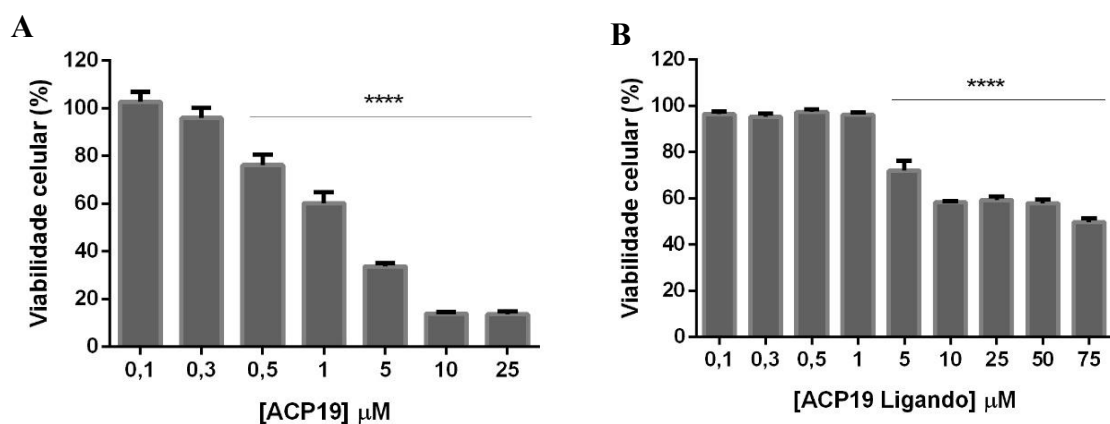
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22877927>5Cn<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.016>.
- Toole, S.A.O. et al., 2003. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity / resistance in malignant gynaecological tumours. *Cancer Detection and Prevention*, 27, pp.47–54. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600417>
- Topala, T. et al., 2014. Bovine Serum Albumin Interactions With Metal Complexes. *Clujul Medica*, 87(4), pp.215–219. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4620676/>
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S., 2005. Another way to die : autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.*, 12(suppl 2), pp.1528–1534. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247500>
- Ullah, M.F., 2008. Cancer Multidrug Resistance (MDR ): A Major Impediment to Effective Chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9(1), pp.1–6. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439063>
- Vermeulen, K., Bockstaele, D.R. Van & Berneman, Z.N., 2003. The cell cycle : a review of regulation , deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3), pp.131–149. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814430>
- Wachter, E. et al., 2012. Light-activated ruthenium complexes photobind DNA and are cytotoxic in the photodynamic therapy window. *Chem. Commun*, 48, pp.9649–9651. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cc/c2cc33359g/unauth#!divCitation>
- Wagner, T. et al., 2017. Polyethylene glycol-functionalized poly (Lactic Acid-co-Glycolic Acid) and graphene oxide nanoparticles induce pro-inflammatory and apoptotic responses in *Candida albicans*-infected vaginal epithelial cells. *PLoS ONE*, 12(4), e0175259. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28369145>
- Wang, P., Henning, S.M. & Heber, D., 2010. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS ONE*, 5(4), e10202. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20419137>
- Watanabe, T. et al., 2012. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum ( JSCCR ) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Incol*, 20(2), pp.207–239. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4653248/>
- Webb, P.M. & Jordan, S.J., 2016. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 41 pp.3–14. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27743768>.
- Weiss, A. et al., 2014. In vivo anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru(h6-p-cymene)- Cl<sub>2</sub>(pta)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas. *Chem. Sci*, 5, pp.4742–4748. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/sc/c4sc01255k#!divAbstract>
- WHO, 2017. World Health Organization 2012. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [Accessed February 19, 2017].
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K. & Searson, P.C., 2011. The physics of cancer : the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 11, pp.512–522. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3080>.
- Xu, H. et al., 2013. Characterization of the Interaction between Eupatorin and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Molecular Modeling Methods. *Int J Clin Incol*, 14, pp.14185–14203. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3742238/>
- Yap, T.A., Carden, C.P. & Kaye, S.B., 2009. Beyond chemotherapy : targeted therapies in ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9, pp.167–181. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19238149>
- Zhang, C.X. & Å, S.J.L., 2003. New metal complexes as potential therapeutics. 7(4), pp.481–489. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941423>
- Zhang, H. et al., 2011. RasGAP-derived peptide 38GAP potentiates the cytotoxicity of cisplatin through inhibitions of Akt, ERK and NF- $\kappa$ B in colon carcinoma HCT116 cells. *Cancer Letters*, 308(1), pp.62–70. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.04.014>.
- Zhang, P. & Sadler, P.J., 2017. Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. *Eur. J. Inorg. Chem.*, pp 1541–1548. Available at: doi:10.1002/ejic.201600908
- Zhang, Z. et al., 2015. Anthracyclines potentiate anti-tumor immunity: A new opportunity for



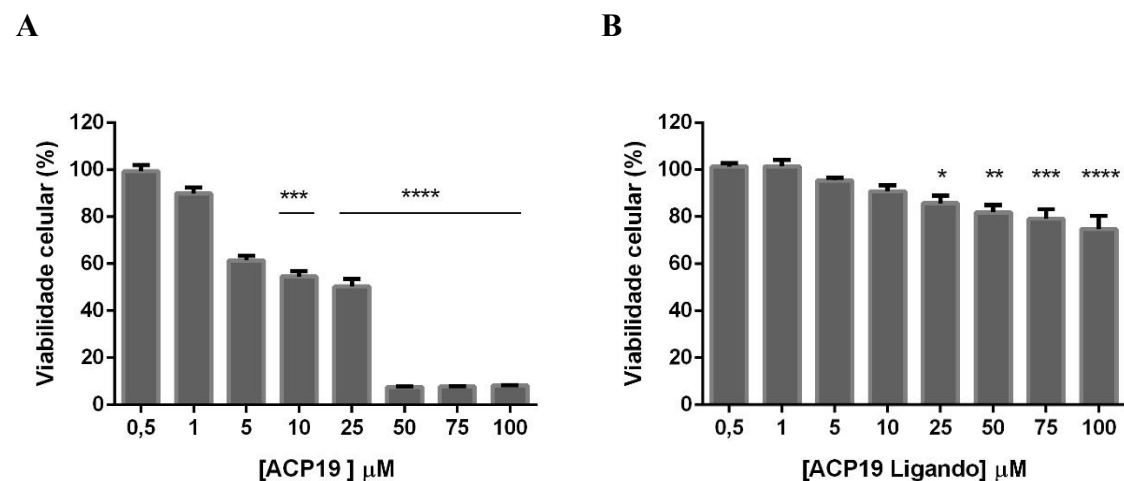
- chemoimmunotherapy. *Cancer Letters*, pp.1–5. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.002>.
- Zijl, F. Van, Krupitza, G. & Mikulits, W., 2011. Initial steps of metastasis : Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 728(1–2), pp.23–34. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.002>.
- Zoubeidi, A. & Gleave, M., 2012. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(10), pp.1646–1656. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.010>.

## 7. Anexos

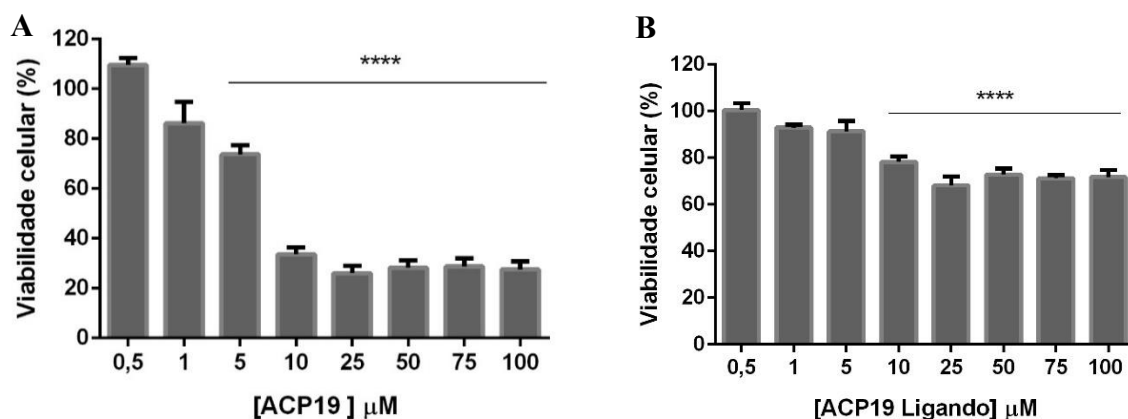
### 7.1 Anexo A



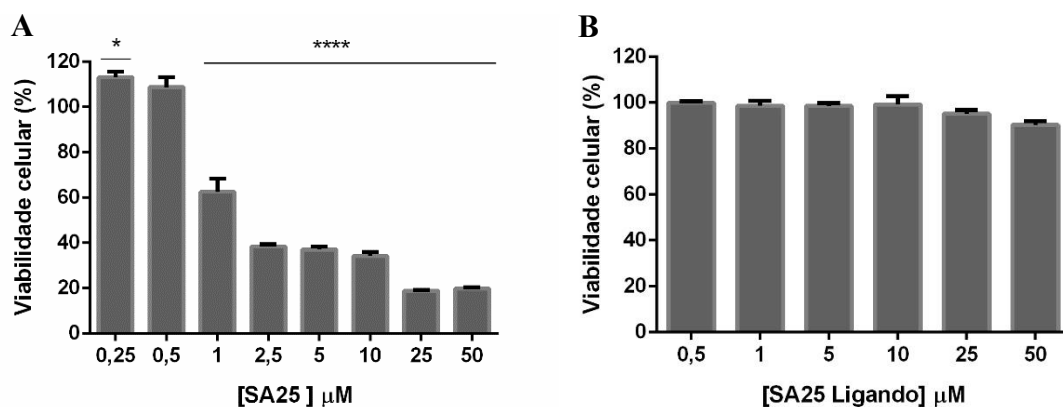
**Figura A.7.1 – Viabilidade celular na linha tumoral HCT116 após a exposição de 48 h ao complexo ACP19 (A) e do ligando ACP19 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controlo (células + 0,1% (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controlo de cada complexo e linha celular).



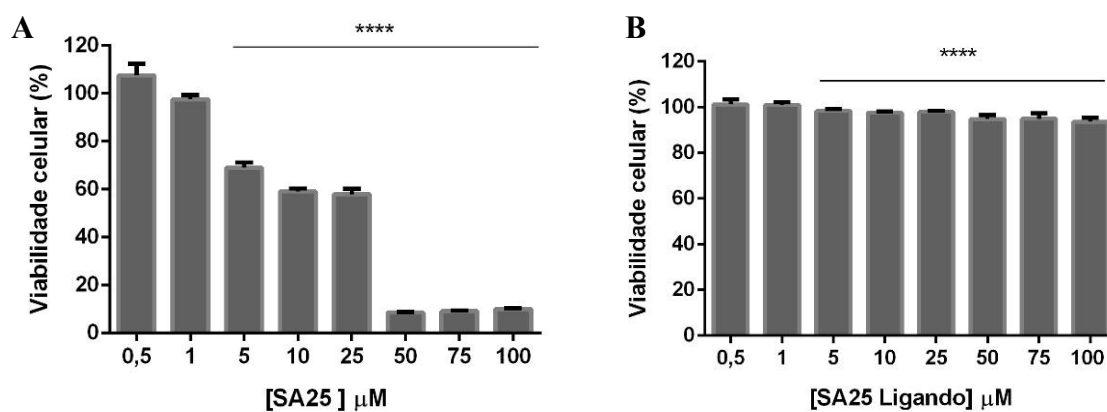
**Figura A.7.2 – Viabilidade celular na linha tumoral A549 após a exposição de 48 h ao complexo ACP19 (A) e do ligando ACP19 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controlo (células + 0,1% (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controlo de cada complexo e linha celular).



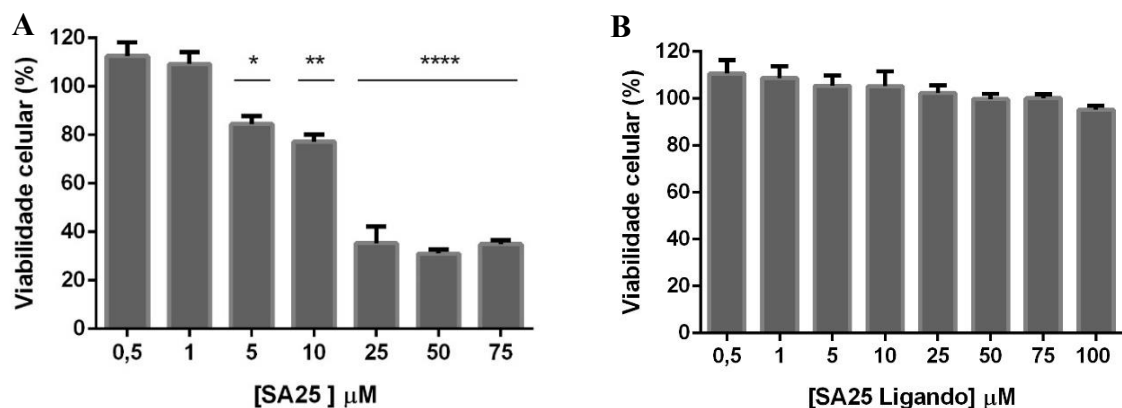
**Figura A.7.3 – Viabilidade celular na linha tumoral MCF7 após a exposição de 48 h ao complexo ACP19 (A) e do ligando ACP19 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM ( $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



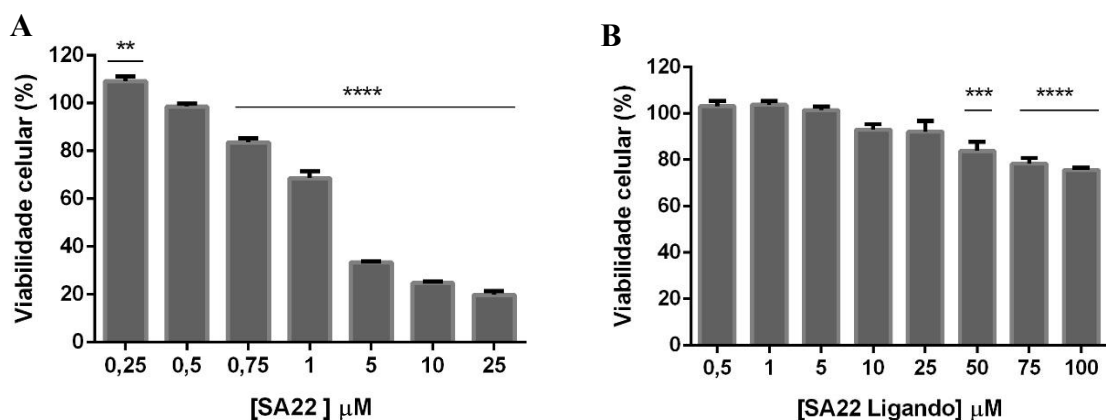
**Figura A.7.4 – Viabilidade celular na linha tumoral HCT116 após a exposição de 48 h ao complexo SA25 (A) e do ligando SA25 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



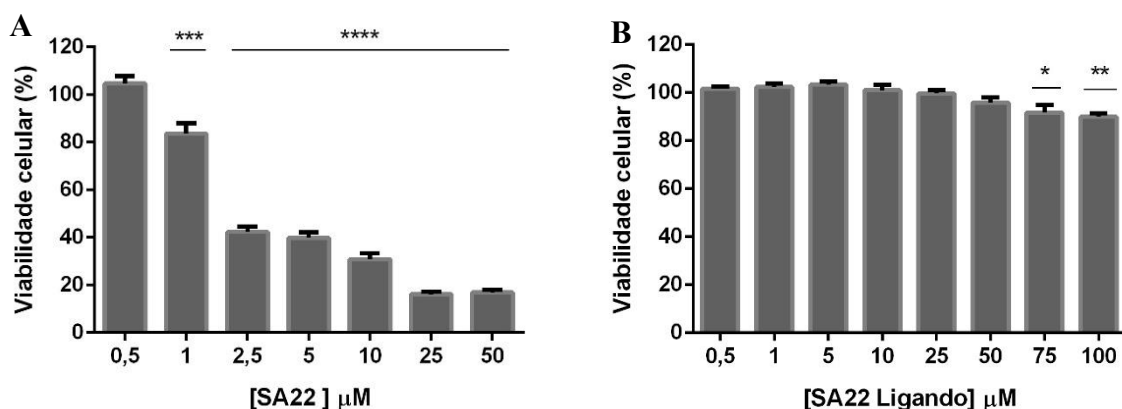
**Figura A.7.5 – Viabilidade celular na linha tumoral A549 após a exposição de 48 h ao complexo SA25 (A) e do ligando SA25 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



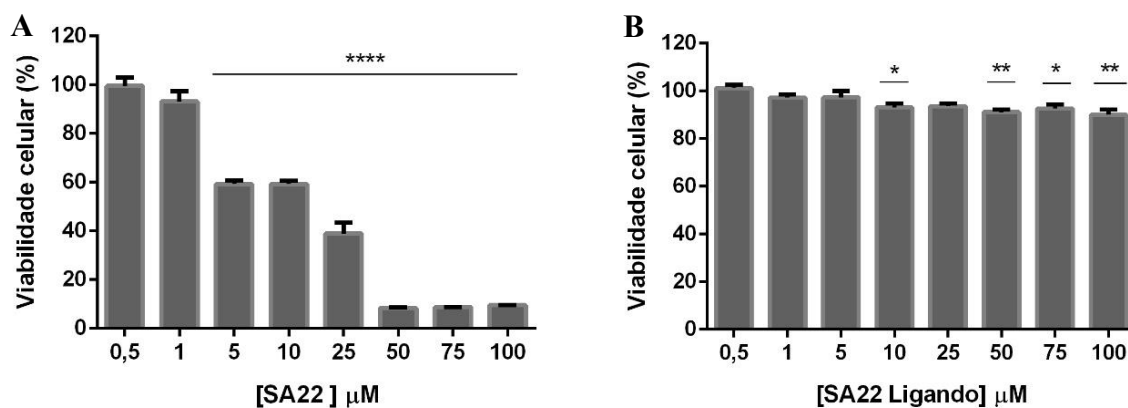
**Figura A.7.6 – Viabilidade celular na linha tumoral MCF7 após a exposição de 48 h ao complexo SA25 (A) e do ligando SA25 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) DMSO). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



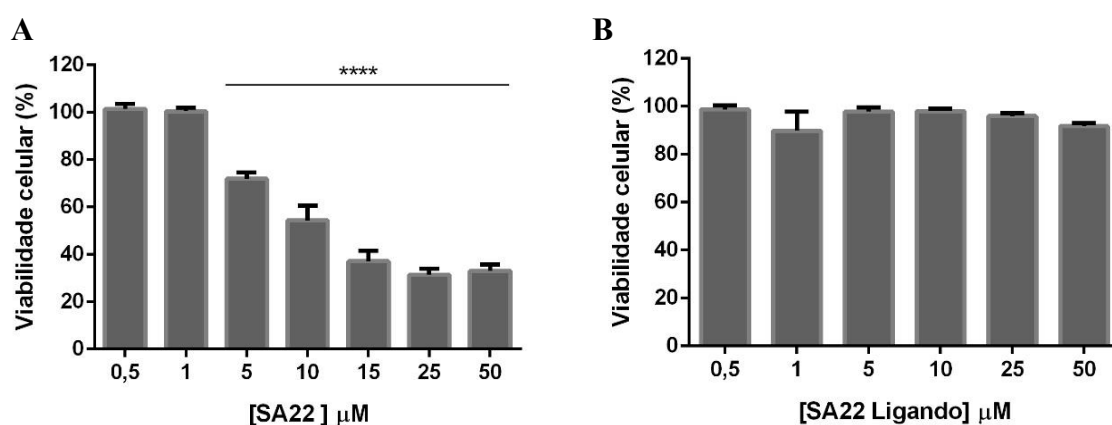
**Figura A.7.7 – Viabilidade celular na linha tumoral A2780 após a exposição de 48 h ao complexo SA22 (A) e do ligando SA22 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



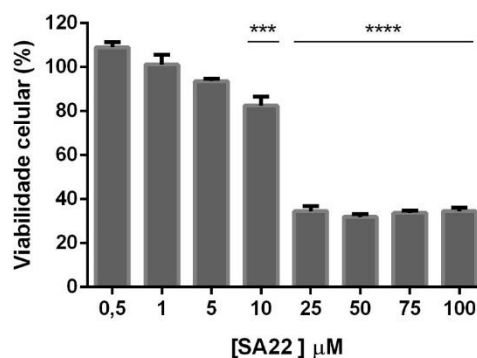
**Figura A.7.8 – Viabilidade celular na linha tumoral HCT116 após a exposição de 48 h ao complexo SA22 (A) e do ligando SA22 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



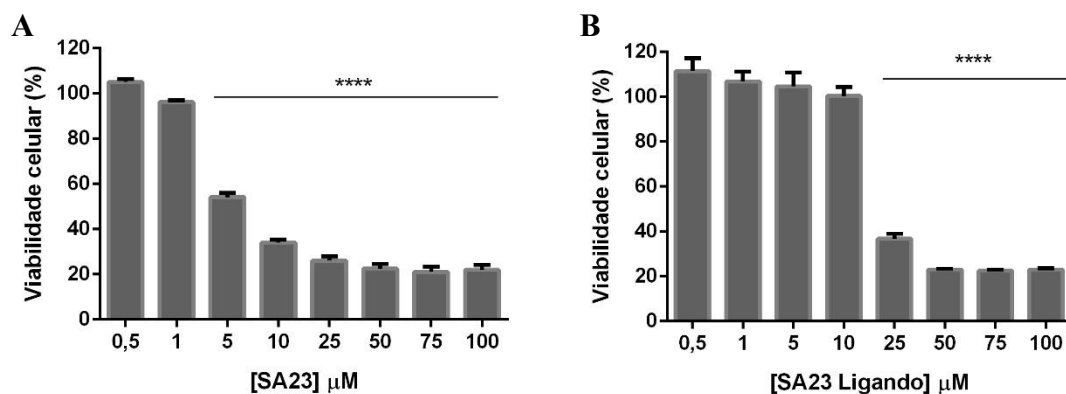
**Figura A.7.9 – Viabilidade celular na linha tumoral A549 após a exposição de 48 h ao complexo SA22 (A) e do ligando SA22 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



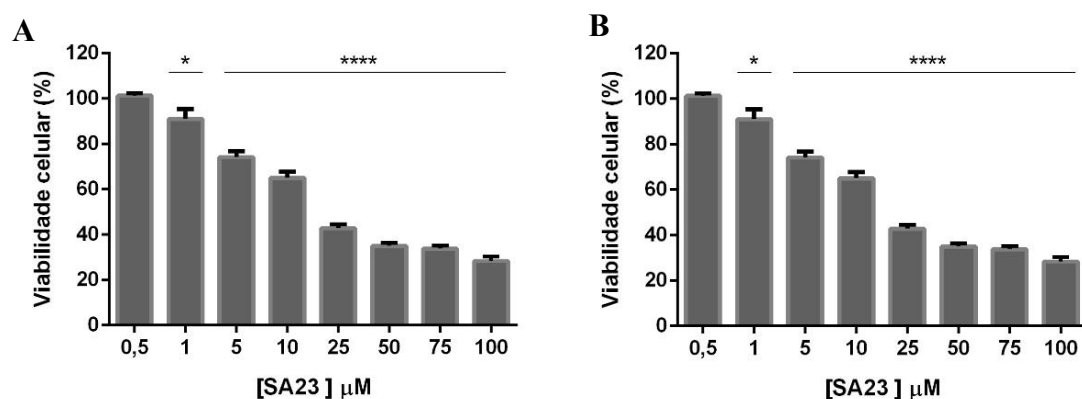
**Figura A.7.10 – Viabilidade celular na linha tumoral MCF7 após a exposição de 48 h ao complexo SA22 (A) e do ligando SA22 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



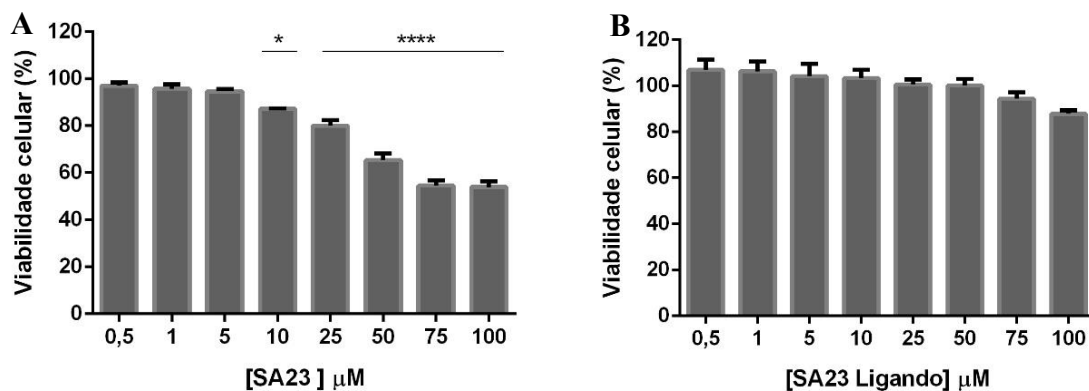
**Figura A.7.11 – Viabilidade celular em Fibroblastos após a exposição de 48 h ao complexo SA22.** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



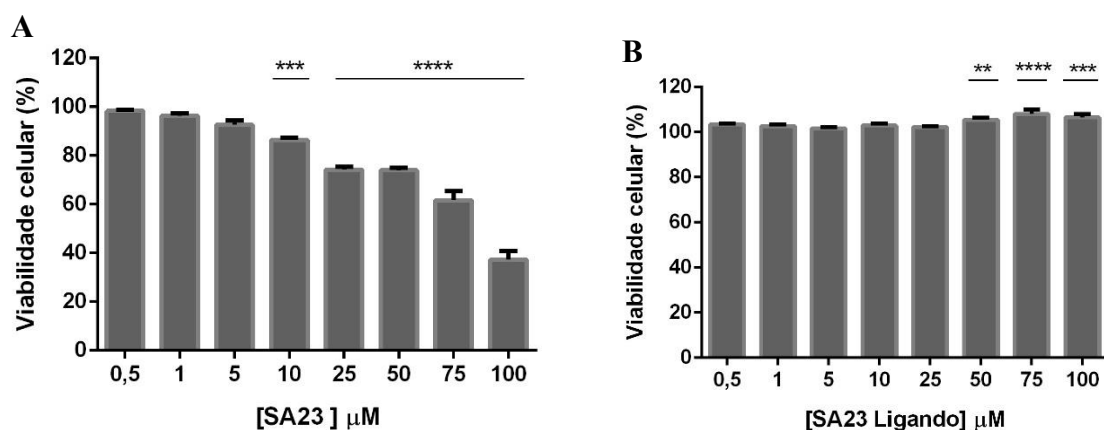
**Figura A.7.12 – Viabilidade celular na linha tumoral A2780 após a exposição de 48 h ao complexo SA23 (A) e do ligando SA23 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



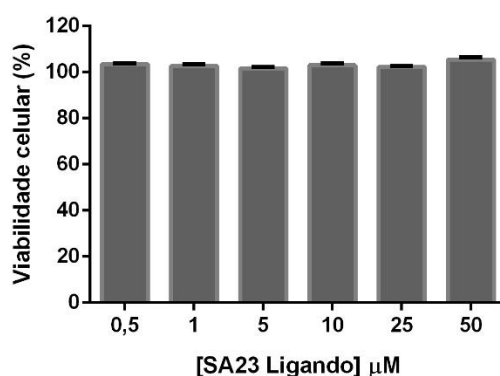
**Figura A.7.13 – Viabilidade celular na linha tumoral HCT116 após a exposição de 48 h ao complexo SA23 (A) e do ligando SA23 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



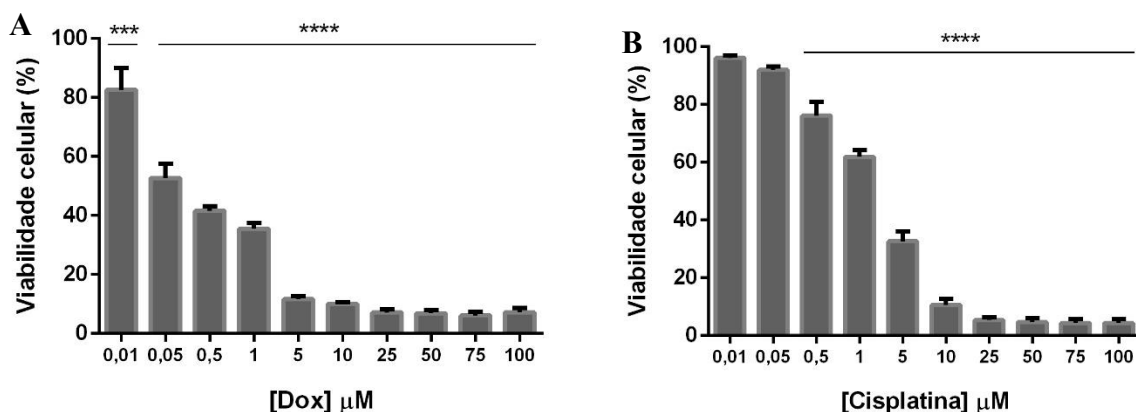
**Figura A.7.14 – Viabilidade celular na linha tumoral A549 após a exposição de 48 h ao complexo SA23 (A) e do ligando SA23 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



**Figura A.7.15 – Viabilidade celular na linha tumoral MCF7 após a exposição de 48 h ao complexo SA23 (A) e do ligando SA23 (B).** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



**Figura A.7.16– Viabilidade celular em Fibroblasts após a exposição de 48 h ao complexo SA23.** Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao controle (células + 0,1% (v/v) Etanol). Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).



**Figura A.7.17 – Viabilidade celular na linha tumoral A2780 após a exposição de 48 h da Doxorubicina(A) e da Cisplatina.** Os valores da viabilidade celular da DOX foram normalizados em relação ao controle (células + 0,2% (v/v) DMSO), enquanto que os valores da Cisplatina foram normalizados em relação a células + 0,9% (p/v) NaCl. Os valores apresentados são referentes a três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao SEM (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (comparando com o controle de cada complexo e linha celular).

## 7.2 Anexo B

Solução tampão TAE 10x (stock), pH 8,0

|           |        |
|-----------|--------|
| Tris-Base | 48,4 g |
|-----------|--------|

|      |        |
|------|--------|
| EDTA | 3,72 g |
|------|--------|

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| Ácido acético glacial | 11,42 mL |
|-----------------------|----------|